



# **Bioprodução de ácido succínico a partir de glicerina bruta: Avaliação de aceptores de elétrons e fontes de nitrogênio orgânicas**

Marcela Jauhar Cardoso Mendonça Bessa

## **Trabalho de Conclusão de Curso**

Orientadoras

Prof<sup>a</sup> Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.  
Lizeth Yuliana Acevedo Jaramillo, D.Sc

Novembro de 2020

# **BIOPRODUÇÃO ÁCIDO SUCCÍNICO A PARTIR DE GLICERINA BRUTA: AVALIAÇÃO DE ACEPTORES DE ELÉTRONS E FONTES DE NITROGÊNIO ORGÂNICAS**

***Marcela Jauhar Cardoso Mendonça Bessa***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenharia Química.

Aprovado por:

---

Carlos André Vaz Junior, D.Sc.

---

Mariana Ruiz Frazão Santiago, D.Sc.

---

Vitor Rafael Leal Oliveira, M.Sc.

Orientado por:

---

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

---

Lizeth Yuliana Acevedo Jaramillo, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Novembro de 2020

## Ficha Catalográfica

Bessa, Marcela

Bioprodução de ácido succínico a partir de glicerina bruta: Avaliação de aceptores de elétrons e fontes de nitrogênio orgânicas / Marcela Jauhar Cardoso Mendonça Bessa. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2020.

ix, 53 p.; il.

(Trabalho de conclusão de curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2020.

Orientadoras: Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Lizeth Yuliana Acevedo Jaramillo

1. *Basfia succiniciproducens* 2. Anaerobiose 3. Heterofermentação 4. Trabalho de conclusão de Curso (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Lizeth Yuliana Acevedo Jaramillo. I. Bioprodução de ácido succínico a partir de glicerina bruta: Avaliação de aceptores de elétrons e fontes de nitrogênio orgânicas

## **AGRADECIMENTOS**

De início gostaria de agradecer aos meus pais, Elizabeth e Marcelo, meus exemplos de vida, pelos conselhos dados, alegrias compartilhadas a cada vitória, pelo apoio e carinho que sempre tiveram comigo. Eles e minha irmã Beatriz, foram minha fortaleza nos momentos mais difíceis dessa jornada. Agradeço ao meu namorado, Maicon Douglas, meus primos, e meus amigos, que estiveram ao meu lado nessa trajetória e me ajudaram a aliviar as preocupações. Sobretudo agradeço ao Igor Jauhar e Filipe Machado pelo auxílio dado durante esta monografia.

Agradeço também aos professores da UFRJ que contribuíram para o meu crescimento, principalmente às minhas orientadoras Lizeth Yuliana e Eliana Flávia por terem sido atenciosas, pacientes, compreensivas ao longo deste trabalho e de outros durante minha iniciação científica. Em especial a Lizeth, por ter sido minha motivação. Aos membros da banca examinadora por se disponibilizarem a avaliar meu trabalho. E fundamentalmente, agradeço a Deus, por ter me dado forças nos momentos difíceis e ter feito esta graduação possível.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau em Engenharia Química.

## **BIOPRODUÇÃO ÁCIDO SUCCÍNICO A PARTIR DE GLICERINA: AVALIAÇÃO DE ACEPTORES DE ELÉTRONS E FONTES DE NITROGÊNIO ORGÂNICAS**

Marcela Jauhar Cardoso Mendonça Bessa

Setembro, 2020

Orientadoras: Prof<sup>a</sup> Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.  
Lizeth Yuliana Acevedo Jaramillo, D.Sc.

A glicerina bruta é gerada em grandes quantidades ao redor do mundo, principalmente como resíduo na indústria do Biodiesel. Devido à crescente geração e acúmulo deste resíduo é necessário o desenvolvimento de processos para seu aproveitamento. Uma alternativa é seu uso como substrato em processos fermentativos para geração de produtos de valor agregado como o ácido succínico. Este ácido orgânico é considerado um bloco de construção em diversas áreas industriais, e reconhecido como um produto de alto potencial biotecnológico. Neste trabalho, foi avaliado o potencial de produção de duas cepas bacterianas - *Actinobacillus succinogenes* 130Z e *Basfia succiniciproducens* JF4016- para produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta. Usando a cepa que mostrou maior produção de ácido succínico foi realizado um planejamento fatorial fracionado (PFF) para análise do efeito dos componentes do meio de fermentação. Finalmente, foi avaliada de forma combinada o uso de extrato de levadura comercial, milhocina e levedura residual cervejeira como fontes de nitrogênio, com o uso de sulfatos e nitratos como aceptores de elétrons. Todos os ensaios foram realizados em frascos agitados, usando um inóculo de 10% (v/v), a 37°C e 130 rpm, com injeção contínua de CO<sub>2</sub> gasoso; após 12 horas amostras foram retiradas para análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Nas condições experimentais avaliadas, se teve a produção de 1293,99 mg/L de ácido succínico por *B. succiniciproducens*, valor 1,68 vezes maior do obtido por *A. succinogenes*. Os resultados do PFF variaram entre 1064,90 mg/L a 2582,85 mg/L, mostrando o efeito positivo e significativo da fonte de nitrogênio orgânica e do aceptor de elétrons. Por fim, a avaliação combinada de fontes de nitrogênio e aceptores de elétrons mostrou faixas de concentração de ácido succínico maiores as obtidas inicialmente, com perfis de produção diferenciados, indicando a interação destes componenetes no metabolismo de *B. succiniciproducens*. O extrato de levedura se mostrou como melhor fonte de nitrogênio e o sulfato de sódio o melhor aceptor de elétrons, alcançando concentrações de ácido succínico de 3298, 89 mg/L com extrato de levedura comercial e 3978,04 mg/L com extrato de levedura residual cervejeira, equivalendo em torno de 59% dos produtos de fermentação quantificados.

Palavras chaves: Heterofermentação; Anaerobiose; *Actinobacillus succinogenes*, *Basfia succiniciproducens*; Aproveitamento de resíduos

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
3.1 Ácido succínico.....	4
3.1.1 Aplicações e mercado .....	6
3.2 Produção biotecnológica de ácido succínico .....	8
3.2.1 Micro-organismos produtores .....	8
3.2.2. Processo metabólico para produção de ácido succínico por cepas bacterianas a partir de glicerol .....	9
3.3 Glicerina bruta como fonte alternativa de substrato .....	12
3.4 Aceptores de elétrons .....	14
3.5 Fontes de nitrogênio orgânicas .....	15
3.5.1 Extrato de levedura comercial .....	16
3.5.2     Biomassa residual de indústrias cervejeiras .....	16
3.5.3 Milhocina.....	17
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>19</b>
4.1 Culturas microbianas .....	19
4.2 Verificação da pureza e características morfológicas das cepas.....	19
4.3 Descrição geral das etapas do desenvolvimento experimental .....	20
4.3.1 Preparação dos meios .....	21
4.3.2 Preparação do inóculo .....	22
4.3.3 Processo fermentativo.....	22
4.3.4 Amostragens e análises realizadas .....	23
4.4 Avaliação da capacidade de produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta das cepas <i>Actinobacillus succinogenes</i> e <i>Basfia succiniciproducens</i> .....	24
4.4.1 Teste de hipótese para seleção da cepa com melhor desempenho .....	24
4.5. Planejamento fatorial fracionado para identificação do efeito dos componentes do meio na produção de ácido succínico .....	25

4.6	Avaliação combinada de fontes de nitrogênio orgânicas e aceptores de elétrons .....	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
5.1	Características morfológicas das cepas bacterianas.....	28
5.3	Efeito dos componentes do meio de fermentação na produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta por <i>Basfia succiniciproducens</i> .....	34
5.4	Avaliação combinada de fontes de nitrogênio orgânicas e aceptores de elétrons na produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta por <i>Basfia succiniciproducens</i> .....	37
5.4.1	Avaliação de aceptores de elétrons utilizando extrato de levedura comercial como fonte de nitrogênio .....	37
5.4.2	Avaliação de aceptores de elétrons utilizando milhocina como fonte de nitrogênio.....	39
5.4.3	Avaliação de aceptores de elétrons utilizando a mistura extrato de levedura comercial e milhocina (50/50) como fonte de nitrogênio .....	41
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Estrutura química do ácido succínico .....	4
<b>Figura 3.2.</b> Aplicações e derivados do ácido succínico. ....	7
<b>Figura 3.3.</b> Rota metabólica para produção de ácido succínico por bactérias produtoras naturais. .....	10
<b>Figura 3.4</b> - Alternativas para aproveitamento de glicérias brutas. ....	14
<b>Figura 4. 1</b> - Esquema geral das etapas para desenvolvimento de ensaios fermentação.....	20
<b>Figura 4.2</b> - Sistema para fermentações em frascos agitados com injeção de CO <sub>2</sub> .....	23
<b>Figura 5.1</b> - Crescimento de colônias em meio sólido TSB das cepas <i>A. succinogenes</i> (a) e <i>B. succiniciproducens</i> (b), após 24 h de incubação a 37°C.....	28
<b>Figura 5.2</b> - Imagens microscópicas de cultivos de <i>B. succiniciproducens</i> em: (a) meio sólido TSB por 12 horas; (b) meio sólido TSB por 24 horas; (c) caldo TSB por 12 horas; (d) caldo TSB por 24 horas .....	29
<b>Figura 5.3</b> - Imagens microscópicas de cultivos de <i>A. succinogenes</i> crescidos em (a)meio sólido TSB por 12 horas; (b) meio sólido TSB por 24 horas; (c) caldo TSB por 12 horas; (d) caldo TSB por 24 horas .....	30
<b>Figura 5.4</b> - Diagrama de Pareto para o efeito dos componentes do meio na produção ácido succínico a partir da glicerina bruta por <i>B. succiniciproducens</i> JF4016 para 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO <sub>2</sub> . ■ Efeito positivo; ■ Efeito negativo; α= 0,05....	36
<b>Figura 5.5</b> - Produção de metabólitos a partir glicerina bruta por <i>B. succiniciproducens</i> após 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO <sub>2</sub> , usando extrato de levedura comercial como fonte de nitrogênio e diferentes aceptores de elétrons .....	38
<b>Figura 5.6</b> - Produção de metabólitos a partir glicerina bruta por <i>B. succiniciproducens</i> após 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO <sub>2</sub> , usando milhocina como fonte de nitrogênio e diferentes aceptores de elétrons .....	40
<b>Figura 5.7</b> - Produção de metabólitos a partir glicerina bruta por <i>B. succiniciproducens</i> após 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO <sub>2</sub> , usando extrato de levedura comercial e milhocina na proporção 50/50 como fonte de nitrogênio e diferentes aceptores de elétrons .....	42



**Figura 5.8** - Produção de metabólitos a partir glicerina bruta por *B. succiniciproducens* após 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO<sub>2</sub>, usando extrato de levedura residual como fonte de nitrogênio e diferentes aceptores de elétrons ..... 44

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Propriedades do ácido succínico .....	4
<b>Tabela 4.1</b> - Clasificação das cepas bacterianas adquiridas no banco de micro-organismos DSMZ .....	19
<b>Tabela 4.2</b> - Composição do meio <i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB) para ativação celular .....	21
<b>Tabela 4.3</b> - Composição do meio quimicamente definido (MQDI) para propagação do inóculo... ..	21
<b>Tabela 5.1</b> - Comparação estatística a partir da produção de ácido succínico após 12 horas de fermentação das cepas <i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z e <i>Basfia succiniciproducens</i> JF4016 utilizando a glicerina bruta como substrato e com suprimento direto de CO <sub>2</sub> .....	32
<b>Tabela 5.2</b> - Produção de ácido succínico segundo Planejamento Fatorial Fracionado para verificação da influência dos componentes na produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta pela <i>B. succiniciproducens</i> JF4016 para 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO <sub>2</sub> .....	35

# 1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas tem-se observado uma crescente preocupação com os impactos ambientais, principalmente daqueles relacionados às atividades industriais que fazem uso intensivo de hidrocarbonetos de petróleo com geração de alto nível de poluentes. Isso tem impulsionado o avanço da química verde prioritariamente para dispor produtos ambientalmente seguros no mercado (GARLAPATI *et al.*, 2016; SAXENA *et al.*, 2017; DESSIE *et al.*, 2018).

Os princípios da “Química Verde”, termo que define o desenvolvimento e implementação de processos e de produtos químicos para reduzir ou eliminar o uso ou a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente, já vêm sendo aplicados em diferentes setores industriais, especialmente em países onde a indústria química é bem desenvolvida (LENARDÃO *et al.*, 2003). Particularmente, as tecnologias visam o desenvolvimento autossustentável, contemplando o aproveitamento de recursos renováveis e o gerenciamento de resíduos e rotas biotecnológicas (DHANIA *et al.*, 2020).

Dentre os processos consolidados na área da química verde tem-se a produção de biodiesel, cujo processo produtivo tem como subproduto principal a glicerina bruta, a qual representa 10% do volume de biodiesel produzido. Considerando o aumento global da produção de biodiesel, apresenta-se a geração e o acúmulo de grandes quantidades de glicerina bruta, o que pode afetar negativamente as plantas produtoras deste biocombustível. Além disso, o descarte inadequado de glicerina bruta pode causar danos ambientais, principalmente em corpos de água. Por isso, como já apontavam Dabdoub, Bronzell e Rampin em 2009, deve ser dado um destino adequado com agregação de valor à glicerina bruta gerada, para garantir a economicidade do processo de produção de biodiesel, e evitar danos ambientais. Assim, torna-se necessário a realização de pesquisas que visem um aproveitamento da glicerina bruta. (DHARMARDI *et al.*, 2006; BABAJIDE, 2013).

Uma alternativa interessante para o aproveitamento da glicerina bruta é seu uso como fonte de carbono alternativo em processos biotecnológicos. Seguindo essa ideia, são várias as possibilidades biotecnológicas, incluindo alguns ácidos orgânicos como, por exemplo, o ácido succínico (KOSAMIA *et al.*, 2020). Este ácido orgânico apresenta aplicações em diversos setores industriais e tem sido

considerado pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos e pela Comissão Europeia como um dos doze bioprodutos de maior potencialidade biotecnológica. Outro fato relevante sobre o ácido succínico é que pode ser utilizado como substituto de mais de 250 produtos químicos derivados do benzeno, substância química comprovadamente cancerígena (BEAUPREZ *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, o ácido succínico (AS) é produzido por rotas químicas, que apresentam altos custos, baixa pureza e acarretam danos ambientais devido ao uso de catalizadores (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). A produção de AS por via fermentativa pode ser obtida a partir de várias fontes de carbono, como açúcares simples, o que contempla a pesquisa exploratória e muitas oportunidades de estudos nesta temática.

Dentre os agentes microbianos com capacidade natural para produção de ácido succínico destacam-se espécies bacterianas, que o sintetizam em condição de anaerobiose (ISAR *et al.*, 2006; SADHUKHAN; VILLA; SARKAR, 2016; NGHIEM; KLEFF; SCHWEGMANN, 2017). O metabolismo bacteriano pode se dar a partir de diferentes substratos, incluindo o glicerol, embora com dependência de fontes exógenas de alguns aminoácidos e vitaminas, já que as cepas produtoras de ácido succínico não são capazes de sintetizá-los a partir dos constituintes básicos de um meio de cultura (VLYSIDIS *et al.*, 2011; XI *et al.*, 2013).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo não apenas contribuir na redução do custo da bioprodução de ácido succínico a fim de tornar o bioproduto economicamente competitivo no mercado brasileiro, mas ainda prover estratégia de sustentabilidade para a produção nacional de biodiesel, que gera uma quantidade excessiva de resíduo, a glicerina bruta, de alto impacto ambiental. Deste modo, foi avaliada a fermentação de glicerina bruta, oriunda da produção industrial de biodiesel suplementada com outros resíduos industriais como fonte de nitrogênio. Buscou-se ainda maximizar a biossíntese do bioproduto em um meio pobre que atenda as exigências nutricionais da cultura microbiana, a qual também foi selecionada dentre duas reconhecidamente produtoras de ácido succínico. Por fim, foram investigados alguns sais inorgânicos como aceptores finais de elétrons para aumentar o consumo de substrato, o que pode favorecer a síntese de ácido succínico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de fontes orgânicas de nitrogênio e de aceptores de elétrons inorgânicos na produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta, oriunda da produção industrial de biodiesel, pelo emprego de cepas reconhecidamente produtoras.

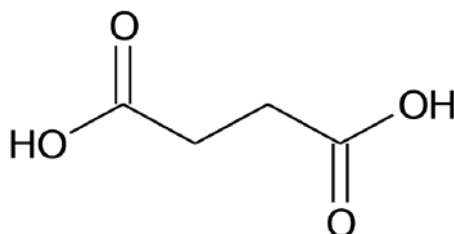
### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar as características morfológicas e pureza das cepas bacterianas *Actinobacillus succinogenes* 130Z e *Basfia succiniciproducens* JF4016;
- Selecionar a cepa bacteriana com melhor desempenho para produção do ácido succínico a partir da glicerina bruta;
- Identificar os componentes do meio de produção com efeito na produção de ácido succínico pela cepa selecionada;
- Avaliar comparativamente a produção de ácido succínico pelo uso de diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura comercial, extrato de levedura residual cervejeira e milhocina seca);
- Avaliar o uso de sais de sulfato e de nitrato como aceptores de elétrons para aumentar a assimilação de substrato no aproveitamento de glicerina bruta para produção de ácido succínico.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Ácido succínico

O ácido succínico, ou ácido 1,4-butanodióico, é um ácido dicarboxílico, de estrutura linear e saturada, com fórmula molecular  $C_4H_6O_4$  e massa molar de 118,09 g/mol. Na temperatura ambiente, este ácido inodoro se apresenta como sólido cristalino na cor branca, solúvel em água, etanol e acetona (SAXENA *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2012). Sua estrutura química e propriedades físico-químicas são apresentadas na Figura 3.1 e, na Tabela 3.1, respectivamente.



**Figura 3.1.** Estrutura química do ácido succínico

**Tabela 3.1** Propriedades do ácido succínico

Ácido succínico $C_4H_6O_4$	
Nome IUPAC	Ácido butanodióico
Massa molar	118,09 g/mol
Grau de funcionalidade	2
Ponto de fusão	185-188 °C
Ponto de ebulição	235 °C
Ponto de inflamação	160 °C
Solubilidade em água	83,2 g/L (25°C)
Densidade relativa	1,572 (25°C)
pH	2,7 (1% em água)
Pressão de vapor	$2,55 \times 10^{-5}$ Pa (25°C)
Calor de combustão	-356,32 Kcal/mol
pKA1; pKA2	4,207; 5,635 (25°C)

Fonte: SAXENA *et al.*, 2017

A produção tradicional do ácido succínico é realizada quimicamente, em processos que incluem etapas de oxidação e hidrogenação catalítica. De forma geral, o processo inicia com o craqueamento do benzeno para geração de butano, o qual é oxidado para formação do anidrido maleico. Posteriormente, o anidrido sofre reações de hidratação e hidrogenação com geração de ácido succínico como produto final. O processo químico requer altas temperaturas e pressões, podendo

ser conduzido de forma homogênea ou heterogênea, a depender do catalisador empregado. Assim, o processo produtivo envolve operações complexas, o que o torna oneroso, e ainda, apresenta baixo rendimento e baixo grau de pureza, além de gerar forte impacto ambiental (CHENG *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; NGHIEM *et al.*, 2017; SAXENA *et al.*, 2017).

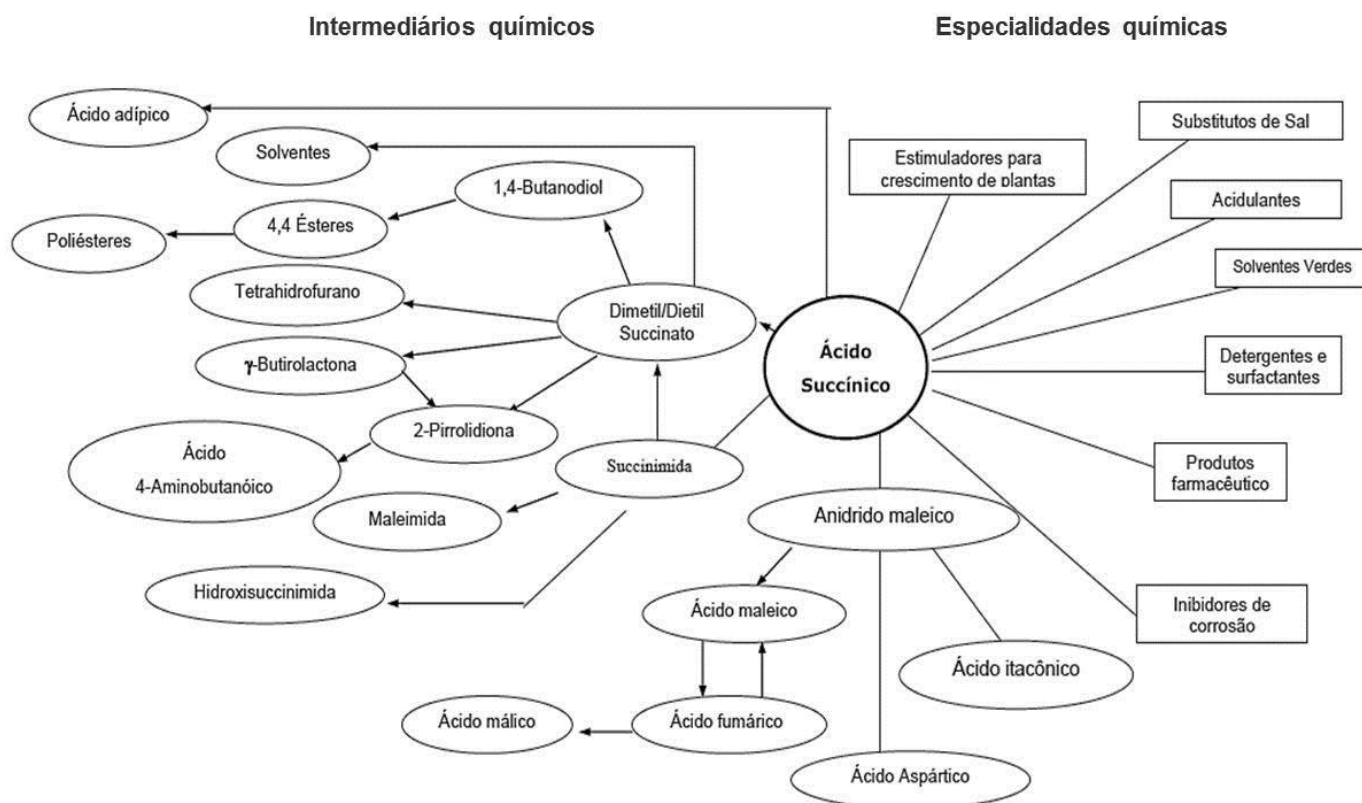
Em contrapartida, a produção biotecnológica do ácido succínico pode ocorrer a partir de carboidratos simples empregando bactérias, principalmente, como agentes produtores, o que permite obter boas produtividades. E mais, como qualquer bioprocessos, é conduzido em condições de operação (temperatura e pressão) brandas, embora apresente características bioquímicas complexas. Logo, para tornar o bioprocessos economicamente competitivo com a rota química devem ser definidos alguns pontos, prioritariamente: (i) aproveitamento de fontes alternativas de matérias primas/substratos, em particular, o emprego de resíduos industriais; (ii) otimização das condições nutricionais, o que pode contribuir a redução de custos; e (iii) ajuste das condições operacionais para favorecer a rota metabólica de síntese de ácido succínico pela cultura microbiana potencialmente produtora (AMPELLI *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2012; BABAEI *et al.*, 2019).

Diante disso, existe a perspectiva de uma forte demanda de ácido succínico produzido por rota fermentativa visto ser esse bioproduto um importante precursor para a síntese de produtos químicos para variados segmentos industriais, além dos benefícios terapêuticos. No entanto, como se trata de um bioprocessos, vários aspectos devem ser bem definidos para maximizar rendimentos e produtividade, bem como a redução de custos de modo que a rota fermentativa apresente competitividade econômica frente à via química. Um lado negativo do bioprocessos é que grandes quantidades de produtos e co-produtos podem inibir a produção celular quando alcançada uma grande quantidade no meio fermentativo. Além disso, as bactérias empregadas são heterofermentativas e, se o processo biotecnológico não for bem delineado, a cogeração de outros compostos químicos poderá requerer tratamentos adicionais do mosto fermentado para recuperação e purificação do produto de interesse, resultando em baixo rendimento e alto custo.

### 3.1.1 Aplicações e mercado

O ácido succínico é reconhecido pelo Departamento de Energia dos EUA (DOE) como um dos 12 bioprodutos com alto potencial biotecnológico e comercial, constituindo-se em um bloco de construção (SAXENA *et al.*, 2017). O ácido succínico é precursor de uma ampla gama de substâncias químicas, incluindo: (i) 1,4-butanodiol, solvente industrial e matéria-prima para fabricação de polibutileno tereftalato, com aplicações no setor automotivo e eletroeletrônico; (ii) gama-butirolactona, componente de removedores de tinta e produtos têxteis; (iii) tetra-hidrofurano, solvente e ingrediente principal de adesivos, tintas de impressão e fitas magnéticas; (iv) ácido adípico, precursor do náilon e matéria-prima para a fabricação de lubrificantes, espumas e produtos alimentícios; (v) ésteres alifáticos lineares, usados na fabricação de resinas, plásticos e outros produtos finais industriais e de consumo, além de vários outros. Portanto, como ilustra a Figura 3.2, pode-se inferir que o ácido succínico atende diversas áreas industriais, incluindo alimentícia, farmacêutica (vitaminas e antibióticos) e química (surfactantes, solventes verdes, polímeros biodegradáveis, fungicidas, e herbicidas, entre outros). Em particular, o ácido succínico pode substituir diversos produtos derivados do benzeno e outros petroquímicos intermediários, possibilitando a redução da emissão de poluentes oriundos de processos tradicionais (ZEIKUS *et al.*, 1999). Adicionalmente, têm sido apontados benefícios do ácido succínico para a saúde humana, como efeitos anti-inflamatório e antimicrobiano, ação antioxidante e estimulante do sistema nervoso, além de promover o fortalecimento da atividade de rins e intestinos e do sistema imunológico (Âmbar Báltico Brasil, 2020). Esta característica tem ampliado seu uso nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Desta forma, o mercado e a demanda do ácido succínico tem aumentado nos últimos anos gerando um amplo panorama de pesquisa e desenvolvimento biotecnológico.





**Figura 3.2.** Aplicações e derivados do ácido succínico. Fonte: ANDRADE, 2017

Em relação aos aspectos de mercado e evolução da demanda de ácido succínico, a literatura indica que para o ano de 1999 a produção mundial de ácido succínico foi em torno de 15 mil toneladas, com valor entre 5,90 e 8,80 US\$/kg, dependendo do grau de pureza (ZEIKUS *et al.*, 1999). Em 2011, a produção chegou as 40 mil toneladas, geradas majoritariamente por rota química, com valor entre 2,40 e 2,60 US\$/kg, enquanto o preço por produção biotecnológica era de cerca de 3,00 US\$/kg (WEASTRA, 2013). Em 2016, os preços ainda se mantinham: 2,94 US\$/kg para o produto biotecnológico, e ao redor de 2,5 US\$/kg para o produzido por rota petroquímica (PATERAKI *et al.*, 2016). A variabilidade dos preços do petróleo e o potencial de produção do ácido succínico a partir de matérias-primas renováveis e resíduos agro-industriais tem contribuído para a redução de custos dos processos biotecnológicos (NGHIEM *et al.*, 2017).

A tendência de aumento no consumo de ácido succínico, atualmente está sendo impulsionada pelo seu uso nas indústrias de polímeros, surfactantes, de alimentos, e na área da saúde (SAXENA, *et al.*, 2017). Estudos de mercado tem estimado uma produção para 2020 de 700 mil toneladas, com uma taxa de

crescimento anual aproximada de 27,4%, com expectativa de alcançar mais de 760 milhões de toneladas em 2025 (DONATELLA *et al.*, 2016; NGHIEM *et al.*, 2017).

## 3.2 Produção biotecnológica de ácido succínico

### 3.2.1 Micro-organismos produtores

Diversos tipos de micro-organismos apresentam capacidade natural para produção de ácido succínico, compreendendo: (i) fungos filamentosos (*Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Byssoschlamys nivea*, *Lentinus degener*, *Paecilomyces varioti* e *Penicillium viniferum*); (ii) leveduras (*Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Yarrowia lipolytica*), e (iii) bactérias (*Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Bacillus fragilis*, *Bacteriodes fragilis*, *Basfia succiniciproducens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Mannheimia succiniciproducens*) Dentre esses micro-organismos, as bactérias são reconhecidas como os agentes produtores mais eficientes (SONG e LEE, 2006; AHN *et al.*, 2016).

A literatura indica que espécies isoladas do rúmen bovino como *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens* e *Basfia succiniciproducens*, apresentam boa capacidade de produção em condições de anaerobiose e tendo o CO<sub>2</sub> como regulador da rota metabólica, além de possuir capacidade para assimilar diversos substratos, inclusive o glicerol. De forma geral, estas bactérias são Gram negativas, mesofílicas, quimiorganotróficas, capnofílicas e heterofermentativas, podendo produzir ácido succínico, etanol, ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, entre outros (SONG e LEE, 2006; CARVALHO *et al.*, 2014; MAZIERÈ *et al.*, 2017).

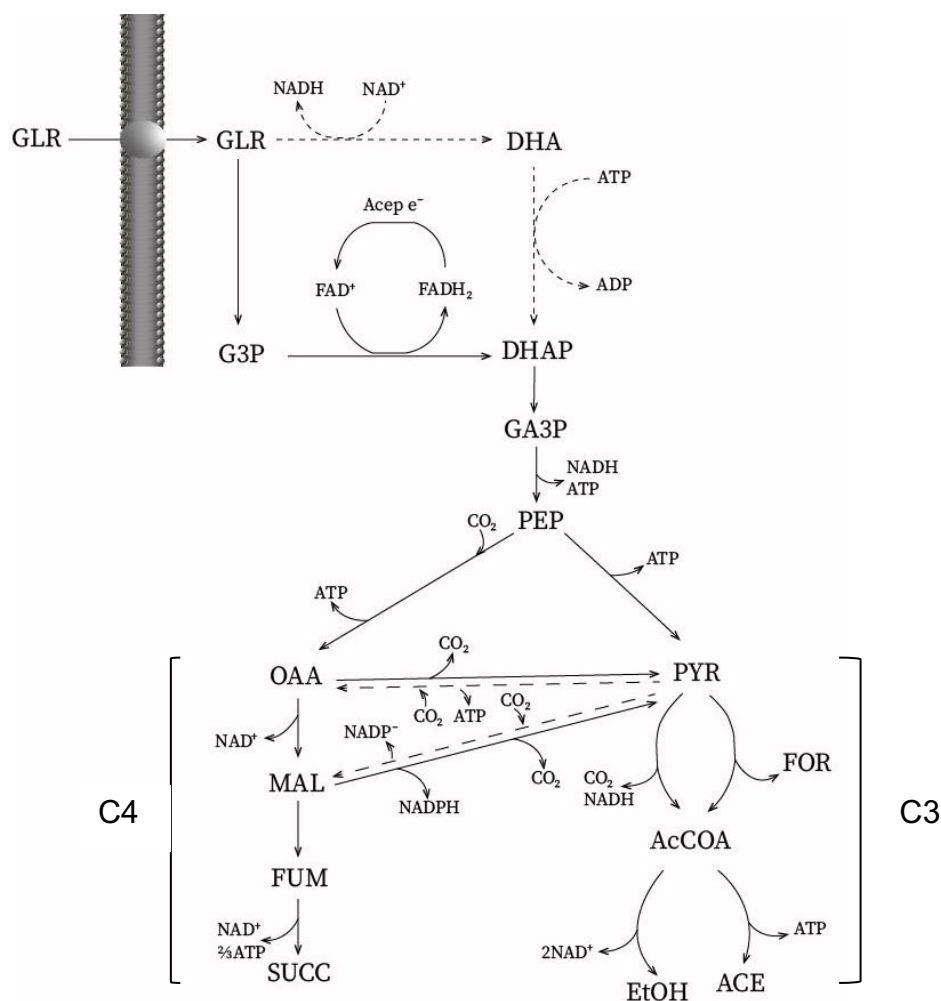
A espécie *Basfia succiniciproducens*, que pertence à família Pasteurellaceae, se apresenta como células imóveis Gram-negativas de morfologia cocoide. É anaeróbia facultativa e quimioheterotrófica, podendo utilizar diversas fontes de carbono, como glicose, galactose, maltose, frutose, manitol, manose, sacarose, xilose e glicerol. Além do ácido succínico, pode sintetizar os ácidos pirúvico, acético e fórmico e, em pequenas quantidades, o ácido láctico e o etanol (SALVACHÚA *et al.*, 2016; LANGE *et al.*, 2017). A primeira descrição desta espécie bacteriana foi publicada por Scholten e Dagele em 2008, mas só mais recentemente que começou a ser explorada sua capacidade de biossíntese de

ácido succínico.

A bactéria *A. succinogenes*, também membro da família Pasteurellaceae, é Gram-negativa embora apresente morfologia microscópica diferenciada da espécie *B. succinoproducens*, em bastonetes ou mesmo pleomórfica. É anaeróbia facultativa, não patogênica, não móvel e não formadora de esporos. Pode fermentar uma ampla variedade de substratos, como glicose, arabinose, celobiose, frutose, galactose, lactose, maltose, manitol, manose, sorbitol, sacarose, xilose e glicerol, tendo como produtos de fermentação os ácidos succínico, acético, fórmico, propiônico, pirúvico, láctico e etanol. Distintamente à *B. succiniciproducens*, os estudos com *A. succinogenes* são mais amplos e desde 1999 tem-se diferentes reportes na literatura (GUETTLER *et al.*, 1999; SONG e LEE, 2006; BEAUPREZ *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010; AHN *et al.*, 2016).

### 3.2.2. Processo metabólico para produção de ácido succínico por cepas bacterianas a partir de glicerol

Um esquema simplificado do processo metabólico das bactérias produtoras de ácido succínico a partir de glicerol em condição de anaerobiose se apresenta na Figura 3.3. O processo se inicia com o transporte das moléculas de glicerol para o interior da célula através da membrana. O transporte é realizado por difusão facilitada, mediada por proteínas transportadoras tipo poro canal, as permeases, localizadas na camada fosfolipídica. Posteriormente, se inicia uma série de reações bioquímicas, iniciando com a formação do intermediário dihidroxiacetona fosfato (DHAP), que pode ocorrer por duas formas: (i) a enzima glicerol desidrogenase oxida o glicerol em dihidroxiacetona (DHA), a qual sofre fosforilação, catalisada pela enzima glicolítica dihidroxiacetona quinase, formando o DHAP; ou (ii) fosforilação do glicerol pela enzima glicerol quinase, para formação do glicerol 3-fosfato (G3P), o qual é oxidado à DHAP pela enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase, com geração de um equivalente redox, devido à redução de um mole de FAD ( CARVALHO *et al.*, 2014; SHINDLER *et al.*, 2014; RUSSMAYER *et al.*, 2019).



GLR: glicerol; G3P: glicerol 3-fosfato; DHA: di-hidroxiacetona; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; PEP: fosfoenol piruvato; OAA: oxaloacetato; MAL: malato; FUM: fumarato; SUCC: ácido succínico; PYR: piruvato; AcCOA: Acetil coenzima A; EtOH: etanol; ACE: ácido acético; FOR: Formiato

**Figura 3.3.** Rota metabólica para produção de ácido succínico por bactérias produtoras naturais.  
Fonte: CARVALHO, 2014.

A partir da dihidroxiacetona fosfato (DHAP), dependendo da cepa bacteriana e condições de operação, pode-se ter síntese de material celular ou formação do fosfoenol piruvato (PEP) mediante uma série de reações enzimáticas. O PEP pode ser convertido em diferentes produtos por dois desvios metabólicos, sendo o desvio C3 referente aos metabólitos três átomos de carbono, e o desvio C4 que corresponde à síntese de ácido succínico (Fig 3.3).

Como se evidencia na figura, pelo desvio C3, o PEP é convertido em piruvato (PYR) mediado pelas enzimas piruvato quinase e PEP sintase, com geração de ATP. Dependendo das condições de operação e da cepa bacteriana, a oxidação do piruvato (PYR) pode dar origem a diversos metabólitos como etanol, e os ácidos láctico, fórmico, cítrico e acético (CIMINI *et al.*, 2016).

Pelo desvio C4, como apresenta a Figura 3.3, o PEP é carboxilado na presença de CO<sub>2</sub> pela ação das enzimas PEP carboxiquinase e/ou PEP carboxilase, levando à formação de oxaloacetato (OAA) e de ATP pela oxidação de ADP. Por isso a carboxilação do PEP é considerada a etapa chave para formação de ácido succínico. Em seguida, o oxaloacetato é reduzido à malato (MAL) pela enzima malato desidrogenase, com reoxidação de NADH. Posteriormente, o malato sofre desidrogenação mediado pela enzima fumarase, gerando o fumarato (FUM), que por sua vez é reduzido, pela ação da enzima fumarato redutase, à ácido succínico com geração de 2/3 de mol de ATP.

Como se pode observar na Figura 3.3, os desvios metabólicos C3 e C4 podem estar conectados e influenciados pela concentração de CO<sub>2</sub> no meio de produção, embora ainda não se tenha clareza total a respeito. Entre algumas destas conexões se tem: (i) a formação de oxaloacetato a partir do piruvato pelas enzimas oxaloacetato descarboxilase e piruvato carboxilase; (ii) a formação de malato a partir do piruvato pela enzima málica; (iii) a possível conversão do OAA em citrato, pela enzima citrato sintase.

De modo a favorecer a produção de ácido succínico é indicado que seja propiciada uma atmosfera rica em CO<sub>2</sub> (SONG e LEE, 2006). Teoricamente, um mol de succinato pode ser produzido a partir de um mol de glicerol e um mol de CO<sub>2</sub>. Porém, de fato isto não acontece, uma vez que parte da fonte de carbono (substrato) é desviada para formação de biomassa e subprodutos, com geração de NAD(P)H e ATP.

A assimilação de glicerol pelas bactérias é também dependente do reciclo do FADH, que é gerado pela ação da enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase durante a formação de DHAP como se apresenta na Figura 3.3. Assim, para que haja regeneração do FAD é necessária a presença de um aceptor final de elétrons para aumentar o consumo de substrato. Embora não tenha sido encontrada na literatura uma abordagem robusta sobre este tema, alguns autores sugerem que o aceptor de elétrons pode ser um metabólito intermediário, como fumarato; ou uma fonte inorgânica externa, como nitrato, dimetilsulfóxido (DMSO) ou óxido de trimetilamina (SCHINDLER *et al.*, 2014). Desta forma, é possível indicar a alta complexidade bioquímica deste bioprocesso. E, demonstra-se a relevância de um estudo abrangente e profundo para chegar a desenvolver um bioprocesso para produção de ácido succínico economicamente vantajoso.

### 3.3 Glicerina bruta como fonte alternativa de substrato

A glicerina bruta é um subproduto das indústrias de sabão, ácidos graxos, e oleoquímicas, embora, aproximadamente 64% da glicerina bruta gerada mundialmente derivem da produção de biodiesel. Esta indústria é responsável por coproduzir em torno de 10 m<sup>3</sup> de glicerina bruta para cada 100 m<sup>3</sup> de biodiesel. Assim, considerando o montante global de volume de biodiesel gerado, passa-se a ter um grande excedente de glicerina. Por exemplo, em 2018, onde cerca de 2,8 milhões de toneladas de glicerina bruta foram cogeradas, com estimativa de alcançar algo em torno de 6 milhões de toneladas em 2025 (KUMAR *et al.*, 2018; RUSSMAYER *et al.*, 2019).

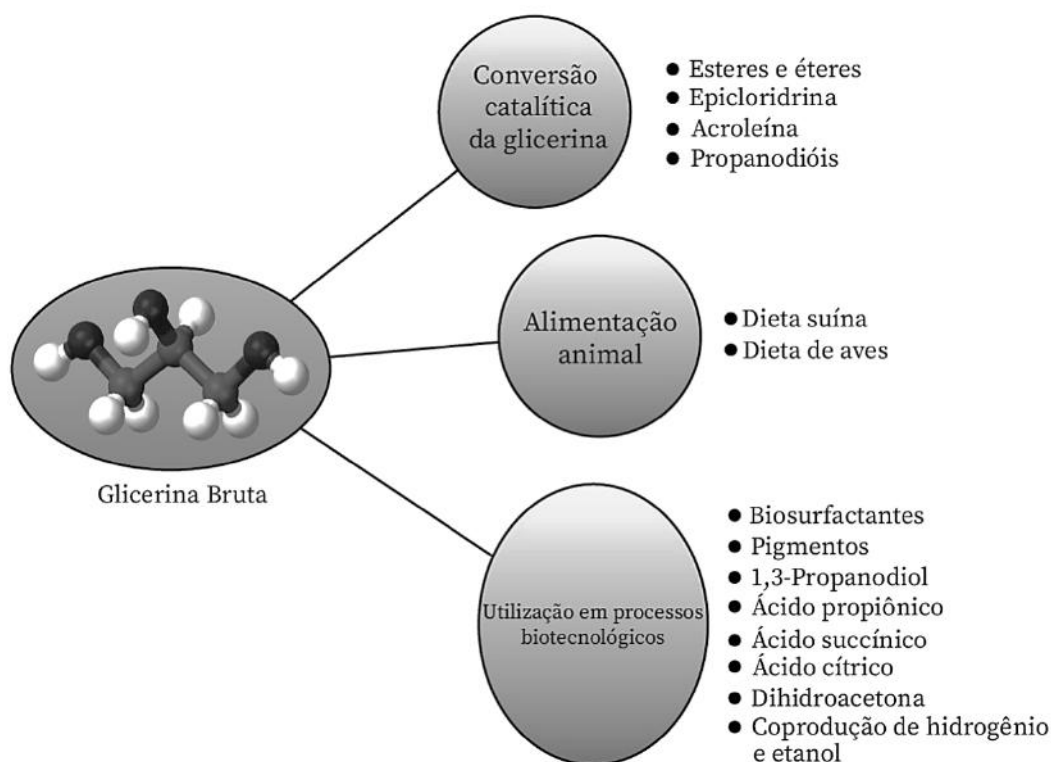
A composição química da glicerina bruta proveniente da indústria do biodiesel é variável, principalmente dependente da matéria-prima e do processo catalítico. Mas, de forma geral, a glicerina bruta pode conter entre 60-80% de glicerol e impurezas, como água, sais, ésteres, álcool, óleo residual e alguns elementos químicos (Na, Ca, K, Mg, P, S), o que afeta negativamente seu valor comercial (QUISPE *et al.*, 2013; RUSSMAYER *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, o aproveitamento da glicerina bruta nas áreas de alimentos, farmacêutica e estética demanda um tratamento prévio para obtenção do glicerol na forma purificada. Em geral, o processo de purificação requer múltiplas etapas, o que eleva seu custo final. A alta disponibilidade de glicerina bruta levou à queda do preço do glicerol de 400\$/t em 2001 para menos de 100\$/t em 2011. No Brasil, dados mais recentes indicam preços de mercado de: cerca 220,00 R\$/t para a glicerina bruta (pureza entre 60-80%); aproximadamente 720,00 R\$/t para a glicerina loira (pureza até 90%) e 1900,00 R\$/t para o glicerol (pureza acima de 95%) (CREFBio, 2017; NDA-UMAR *et al.*, 2019).

Deste modo, há um excedente de glicerina bruta no mercado de baixa demanda, o que pode resultar em armazenamento ou descarte inadequados, impactando negativamente o ambiente. Logo, deve ser imperativo o desenvolvimento sustentável de processos que agreguem valor ao uso da glicerina bruta, o que por sua vez irá impulsionar a produção mundial de biodiesel (ANITHA *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2019; RUSSMAYER *et al.*, 2019).

Na Figura 3.4 encontram-se algumas alternativas para o aproveitamento da glicerina bruta:

- Uso direto – (i) combustão em fornos para obtenção de energia, limitada por problemas de corrosividade e inflamabilidade; (ii) incorporação em rações para alimentação de animais ruminantes, porcos, aves e peixes, requerindo controle na concentração de impurezas (LEONETI *et al.*, 2012; QUISPE *et al.*, 2013).
- Transformação química - envolve processos termoquímicos cujos custos sofrem acréscimos pela necessidade de haver purificação parcial ou total da glicerina bruta, além do alto custo dos catalisadores, e ainda é comprometida pela geração de intermediários tóxicos, e baixas taxas de conversão. Exemplos de possíveis produtos: acroleína, propanodiol, gliceraldeído, propilenoglicol e epicloridina (POSADA *et al.* 2012; CHENG *et al.*, 2013).
- Conversão microbiológica - que apresenta como vantagem, em relação as aplicações anteriores, a baixa demanda de energia e, ainda, a possibilidade de a glicerina bruta ser usada diretamente como fonte de carbono, ou tão somente um pré-tratamento para redução do efeito inibitório de alguns dos seus constituintes. São vários os exemplos de bioprodutos de valor agregado que podem ser obtidos: 1,3-propanodiol, etanol, n-butanol, ácido cítrico, ácido láctico, ácido propiônico, ácido succínico, ácido glicérico, pigmentos, biossurfactantes, polihidroxialcanoatos, hidrogênio, metano, entre muitos outros (GARLAPATI *et al.*, 2016; WESTBROOK *et al.*, 2018; RUSSMAYER *et al.*, 2019).



**Figura 3.4** - Alternativas para aproveitamento de glicerias brutas. Fonte: BABAJIDE, 2013

Em suma, o uso de glicerina bruta em processos biotecnológicos se apresenta como uma alternativa viável, em comparação com outras matérias-primas e substratos tradicionais devido ao seu baixo custo e disponibilidade, não competitividade na alimentação humana, aproveitamento de resíduo com alto potencial poluente, e possível utilização de impurezas presentes na glicerina como elementos nutricionais.

### 3.4 Aceptores de elétrons

Dependendo da capacidade metabólica da bactéria produtora, na produção de ácido succínico a partir de glicerol, poderia ser necessário o uso de um aceptor de elétrons para uma contínua assimilação de moléculas de glicerol. Como observado na Figura 3.3 e na descrição do processo metabólico, durante a oxidação do glicerol 3-fosfato para formação do intermediário dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se tem a geração de um equivalente redox, devido à redução de um mol de FAD. O acúmulo destes equivalentes redutores pode ocasionar o desequilíbrio do potencial redox, limitando o consumo de substrato e consequentemente levando à inibição do metabolismo celular.



Neste sentido, Schindler *et al.* (2014) têm indicado o papel do fumarato como aceptor de elétrons, o qual é produzido como intermediário no desvio metabólico C4. Deve-se considerar que o fumarato é produzido nas últimas reações enzimáticas do desvio C4 e precisaria ser gerado de forma significativa, mantendo um restrito direcionamento da rota metabólica. Assim, este intermediário não poderia cumprir uma função permanente como aceptor de elétrons na regeneração do FAD. Outra possível alternativa que vem sendo cogitada é a incorporação ao meio de um aceptor de elétrons exógeno. Porém, conforme salienta Carvalho *et al.* (2014), o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) pode levar ao aumento do consumo de glicerol, não obstante, pode estimular as enzimas do desvio C3, com aumento da produção de acetato e redução da síntese de ácido succínico (CARVALHO *et al.*, 2014).

De forma geral, foram encontradas poucas publicações referentes ao uso e avaliação de aceptores de elétrons no aproveitamento de glicerina bruta para produção de ácido succínico. Apesar disso, é desejável que o aceptor tenha um baixo custo, não tenha características tóxicas, não gere efeito negativo na produção de ácido succínico e não interfira nas etapas de separação e purificação do produto de interesse.

### **3.5 Fontes de nitrogênio orgânicas**

As bactérias produtoras de ácido succínico são ditas fastidiosas, ou exigentes, uma vez que não são capazes de sintetizar moléculas específicas a partir de um meio mínimo (SHEN *et al.*, 2015). Logo, o seu metabolismo depende estritamente de que sejam atendidas todas as exigências nutricionais, em geral, quanto a disposição de alguns aminoácidos e/ou vitaminas, referidos como fatores de crescimento (IBRAHIM, 2016). Por isso, na composição de muitos meios de cultura são acrescentadas fontes de nitrogênio orgânicas, tradicionalmente extrato de levedura, extrato de carne ou polipeptonas.

Considerando a redução de custos e diminuição de impactos ambientais, tem-se diversos resíduos industriais com potencial de aproveitamento como fontes nutricionais alternativas, entre eles o extrato de levedura residual cervejeiro e a milhocina, os quais serão avaliados neste trabalho para produção de ácido

succínico, processo no qual é usado de forma tradicional o extrato de levedura comercial.

### 3.5.1 Extrato de levedura comercial

Em 1897, Eduard Buchner descobriu que o extrato obtido a partir do cultivo de leveduras apresentava proteínas capazes de contribuir nutricionalmente em processos microbiológicos. Assim, vem sendo utilizado em cultivos celulares especialmente para produção de extrato de levedura comercial. No processo, o material celular é lavado e suspenso em água; nesse momento, ocorre uma etapa de autólise da parede celular da levedura por ação de enzimas da própria célula (SILVA, 2006). O material sofre aquecimento a 60 °C por 15 min para interromper a ação autolítica, seguindo-se etapas de filtração e secagem, para obtenção de extrato na forma de pó seco, não tóxico e de fácil manuseio.

O extrato de levedura comercial apresenta na sua composição 62,5-73,8% de proteína total; 10,0-11,8% de nitrogênio total; 4,5-5,8% de nitrogênio amino; cloreto de sódio < 0,5%; umidade < 6,0%; e pH (solução 2%) entre 6,8-7,2 (SILVA, 2010; SAYED *et al.*, 2012). É uma das principais fontes de nitrogênio orgânicas usadas para o crescimento de micro-organismos fastidiosos, tendo sido indicado seu uso na produção bacteriana de ácido succínico (HAKOBYAN *et al.* 2012). Contudo, embora o extrato de levedura comercial seja uma fonte nutricional de alta qualidade, seu custo é um fator crítico em processos que o requerem em elevadas concentrações (XI *et al.*, 2013).

### 3.5.2 Biomassa residual de indústrias cervejeiras

As leveduras obtidas como subprodutos de processos fermentativos para produção de álcool, como as indústrias de destilarias e cervejeiras, denominadas de leveduras secundárias, são, sobretudo, exploradas como suplemento protéico para rações animais (SANTIN, 1996; ARAUJO *et al.*, 2009). Como aponta Araujo *et al.* (2009), as leveduras se destacam como fonte protéica de alto valor e reserva natural de vitaminas do complexo B.

No caso das cervejarias, este resíduo úmido é separado, desamargado, autolisado e fracionado, dando origem ao extrato de levedura residual, o qual pode ser apresentado na forma úmida ou seca. A revisão de Mathias *et al.* (2014), que

trata da geração de resíduos sólidos pelas indústrias cervejeiras e respectiva caracterização química, reporta ser a levedura residual cervejeira variável com o processo fermentativo, incluindo tipo, concentração e reuso do microrganismo, composição do meio, e condições operacionais (temperatura e pH), entre outros. Em média, é constituída predominantemente por proteínas (35 a 60% em massa seca), de elevado valor nutricional em face do alto conteúdo de aminoácidos essenciais, a saber, lisina, leucina, isoleucina, valina, triptofano, treonina e fenilalanina. Também é fonte de carboidratos (35 a 45%), minerais (5 a 7,5%), tais como Ca, P, K, Mg e Fe, lipídeos (4 a 6%), e vitaminas do complexo B. Portanto, a levedura residual cervejeira apresenta alto valor nutricional (SAKSINCHAI *et al.*, 2001; SOUZA, 2016; SOUZA *et al.*, 2018), além de ser gerada em abundância, uma vez que para cada litro de cerveja produzido são cogerados 15 a 30 g de biomassa em base úmida (90% de umidade) (MATHIAS *et al.*, 2014).

Por sua vez, a elevada quantidade de biomassa de levedura gerada, de alto conteúdo de matéria orgânica (DBO), representa um sério problema para as indústrias cervejeiras e, inclusive, as sucroalcooleiras, uma vez que a legislação ambiental impõe que seja realizado um tratamento prévio para adequação do resíduo às normas vigentes de descarte. Entretanto, estudos mostram seu potencial de aproveitamento em processos biotecnológicos para geração de produtos de valor agregado, incluindo biocombustíveis, enzimas e ácidos orgânicos.

### 3.5.3 Milhocina

A milhocina ou água de maceração do milho é um resíduo obtido no processo de moagem úmida do amido de milho, rico em aminoácidos, vitaminas, carboidratos, sais minerais e polipeptídeos, sendo considerada uma fonte alternativa de nutrientes, principalmente de nitrogênio orgânico. A milhocina se apresenta como líquido viscoso ou em pó, o qual é mais fácil de transportar e manipular. De forma geral, a milhocina bruta é constituída em maior proporção por proteínas e peptídeos, além de carboidratos (açúcares redutores e ácidos lático e glicólico), minerais como cálcio, ferro, magnésio, fósforo e potássio, e vitaminas, como riboflavina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, biotina, A, D, E, K e C, tiamina e inositol (AKHTAR *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2001; RIVAS *et al.*,

2004). Sua composição apresenta concentração de nitrogênio entre 3,8 - 4,5%, teores de açúcares inferiores a 5%, ácido lático entre 5-15%, e aproximadamente 1,0 mg/kg de biotina, com pH variando de 3,5 a 4,1. Considerando sua origem vegetal, a composição da milhocina está sujeita a variações dependendo da qualidade do grão, época do ano e o local de crescimento do milho, além do tipo de processamento (HOFER *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2015).

A milhocina é gerada em grandes quantidades e apresenta potencial poluente devido ao acúmulo e descarte inapropriado. Visto isso, seu uso como fonte alternativa de nitrogênio e de vitaminas tem chamado a atenção para uso na produção de diversas substâncias de interesse industrial, contribuindo com redução de custos e impactos ambientais (LI *et al.*, 2016). Este resíduo tem sido usado em estudos para produção de enzimas, etanol, ácidos orgânicos e também como complemento na fabricação de ração animal. No caso de processos biotecnológicos, pode ser empregado em substituição parcial ou total de fontes nutricionais de alto custo como o extrato de levedura e peptonas (XI *et al.*, 2013).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Culturas microbianas

Neste trabalho foram usadas suspensões celulares criopreservadas (-80°C) das cepas bacterianas *Actinobacillus succinogenes* 130Z e *Basfia succiniciproducens* JF4016. Estas cepas foram adquiridas pelo Laboratório de Biocorrosão, Biodegradação e Biossíntese no banco de micro-organismos alemão *Leibniz Institute DMSZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, a descrição de cada cepa se apresenta na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** – Classificação das cepas bacterianas adquiridas no banco de micro-organismos DSMZ

<b><i>Actinobacillus succinogenes</i> Guettler et al. (1999)</b>	
DSM Nº	22257 (tipo de cepa)
Designação da cepa	130Z
Outra coleção	ATCC 55618; CCUG 43843; CIP 106512
Isolada de	Rúmen de gado
Número de acesso GenBank	16S rRNA gene: AF024525
Grupo de risco	1 (Classificação German TRBA)
Domínio	Bactéria
Phylum	Proteobactéria
Família	<i>Pasteurellaceae</i>
Gênero	<i>Actinobacillus</i>
Espécie	<i>Actinobacillus succinogenes</i>
<b><i>Basfia succiniciproducens</i> Kuhnert et al. (2010)</b>	
DSM Nº	22022
Designação da cepa	JF4016
Outra coleção	CCUG 57335
Isolada de	Rumen de vaca Simmental
Número de acesso GenBank	16S rRNA gene: FJ463881
Grupo de risco	1 (Classificação German TRBA)
Domínio	Bactéria
Phylum	Proteobactéria
Família	<i>Pasteurellaceae</i>
Gênero	<i>Basfia</i>
Espécie	<i>Basfia succiniciproducens</i>

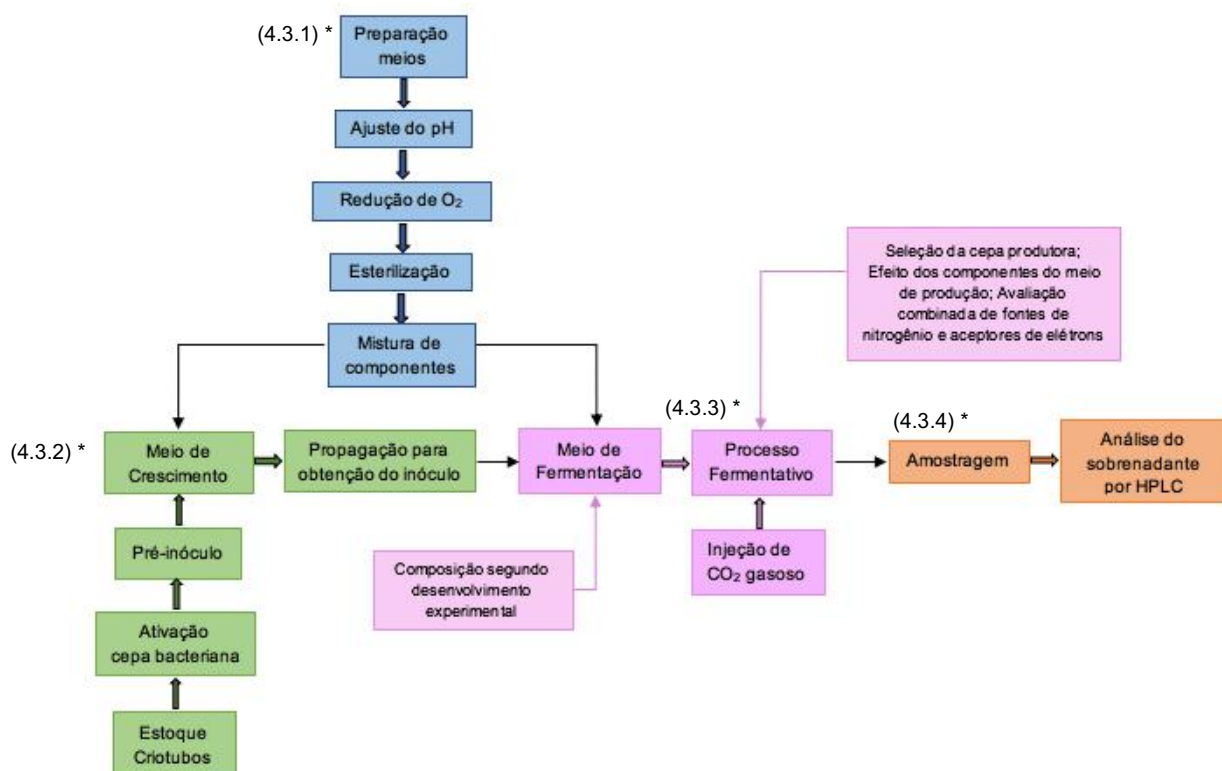
### 4.2 Verificação da pureza e características morfológicas das cepas

Foram realizados cultivos das duas culturas microbianas, individualmente, em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) sólido e líquido, com incubação a 37°C, por 12 e 24 horas quando feita a observação das morfologias macroscópicas e microscópicas. As características macroscópicas das colônias foram observadas pelas técnicas de plaqueamento e esgotamento. Já para a análise microscópica em ambos os meios

foi usado a técnica de coloração diferencial de Gram, sendo as células observadas ao microscópico (NIKON Eclipse E200), no aumento total de 1000 x, para caracterização da morfologia e verificação da pureza da cultura nas diferentes fases de cultivo.

### 4.3 Descrição geral das etapas do desenvolvimento experimental

De forma geral, o desenvolvimento dos ensaios de fermentação incluiu quatro etapas: (i) preparação dos meios para crescimento e produção; (ii) preparação do inóculo; (iii) fermentação a partir de glicerina bruta; e (iv) coleta e análise de amostras. Uma descrição gráfica destas etapas se apresenta na Figura 4.1, e uma descrição mais detalhada será apresentada nos itens seguintes.



\* Esses números correspondem ao subtítulo da descrição de cada uma das etapas experimentais

**Figura 4. 1** - Esquema geral das etapas para desenvolvimento de ensaios fermentação

#### 4.3.1 Preparação dos meios

Na Figura 4.1 a preparação dos meios está representada pela cor azul e inclui os meios de ativação, propagação do inóculo e produção a partir de glicerina. Para ativação foi utilizada uma preparação pronta do meio TSB (Sigma, 22092), o qual é altamente nutritivo e indicado para micro-organismos exigentes, como as cepas bacterianas usadas neste trabalho, devido a sua rica e complexa composição química (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2** - Composição do meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) para ativação celular

Componente	Concentração (g/L)
Peptona de caseína	17,0
Peptona de soja	3,0
Glicose	2,5
NaCl	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5

\*o meio sólido foi acrescido de 15 g/L de Agar-agar.

A propagação do inóculo foi realizada no meio referendado MQDI (Meio quimicamente definido), cuja composição (Tabela 4.3) foi definida segundo dados da literatura (SHEN *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2016; JARAMILLO *et al.*, 2019).

**Tabela 4.3** - Composição do meio quimicamente definido (MQDI) para propagação do inóculo

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	10,0
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
Extrato de levedura	5,0
K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15,5
NaHPO <sub>4</sub>	8,5
MgCl <sub>2</sub>	0,2

O meio de produção teve glicerina bruta, proveniente da produção industrial de biodiesel (Petrobrás), como principal fonte de carbono. Porém, a composição foi variada, sendo definida no decorrer do desenvolvimento experimental.

Os meios de ativação, propagação e produção foram preparados em água destilada, tendo seu pH inicial ajustado em torno de 7,0 com adição de NaOH 4M. Dependendo do meio, alguns dos seus constituintes (glicose, glicerina bruta,  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{CaCl}_2$ ) foram preparados separadamente e as soluções incorporadas aos meios assepticamente, com auxílio de seringa e agulha estéreis, antes da sua inoculação.

Os meios foram distribuídos em frascos de penicilina, fechados com tampa de borracha e lacrados com selos de alumínio. Em seguida, houve borbulhamento de nitrogênio gasoso por 15 min e aquecimento moderado para estabelecer condição de anaerobiose. Os meios foram esterilizados por autoclavação a 121 °C por 20 minutos.

#### 4.3.2 Preparação do inóculo

Para todos os ensaios, a preparação do inóculo, representada pela cor verde na Figura 4.1 incluiu a ativação do material celular criopreservado, seguida da propagação. Toda manipulação do material microbiológico foi realizada assepticamente, com ajuda de seringa e agulha, em câmara de fluxo laminar.

Para ativação das células criopreservadas, 1 mL da suspensão contida em um criotubo foi transferida para um frasco de penicilina contendo 30 mL do meio TSB e incubada a 37°C durante 15 horas, obtendo-se uma alta densidade de células ativas. Posteriormente, frascos de penicilina de 100 mL contendo 90 mL do meio de crescimento MQDI foram inoculados com 10 % (v/v) da suspensão celular obtida na ativação. Em seguida os frascos foram incubados em shaker, a 37°C e 130 rpm por 7 horas, obtendo-se células na fase exponencial para serem usadas como inóculo na etapa de produção.

#### 4.3.3 Processo fermentativo

A cor rosa dos blocos na Figura 4.1 refere-se aos ensaios fermentativos conduzidos para produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta, as quais foram realizadas em frascos de penicilina de 100 mL contendo 80 mL do meio de produção correspondente. Para todas as fermentações foi usado um inóculo de 10% (v/v) de células na fase exponencial. Aos frascos foi conectado um sistema



formado por agulhas, mangueiras e filtros, para permitir a injeção de CO<sub>2</sub> gasoso durante todo o período experimental (Figura 4.2). As fermentações foram realizadas a 37 °C e 130 rpm, por 12 horas, com injeção contínua de CO<sub>2</sub> na vazão de 0,5 L/min.



**Figura 4.2.** Sistema para fermentações em frascos agitados com injeção de CO<sub>2</sub>

#### 4.3.4 Amostragens e análises realizadas

Amostras de 2 mL coletadas no início e no final das fermentações foram centrifugadas a 10.000 rpm (9,6G) durante 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de filtro de seringa de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µm e armazenado em vial de vidro para estoque no freezer. Posteriormente, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no Laboratório de Biocatálise do Instituto Nacional de Tecnologia (INT). As condições cromatográficas foram: cromatógrafo Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific); coluna: AMINEX HPX87H (Biorad); detector RI (50°C), detector UV (210 nm), fase móvel com solução 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; eluição isocrática, temperatura do forno 50 °C, volume de injeção 20 µL, fluxo 0,6 mL/min e tempo da corrida 30 min (JARAMILLO *et al*, 2019).

#### 4.4 Avaliação da capacidade de produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta das cepas *Actinobacillus succinogenes* e *Basfia succiniciproducens*

Dois conjuntos de ensaios independentes com 6 réplicas foram desenvolvidos em frascos agitados para avaliar a capacidade de produção de ácido succínico das cepas bacterianas usando glicerina bruta como fonte de substrato. Foi usado o meio de produção com a seguinte composição em g/L: 10,0 de substrato, 10,0 extrato de levedura, 8,5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,525 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,775 NaCl, 0,175 CaCl<sub>2</sub>, 8,3 NaHCO<sub>3</sub>, e 10,0 MgCO<sub>3</sub>. As características para preparação do meio e condições de operação se encontram descritas no item 4.3.

A glicerina bruta residual da produção de biodiesel usada neste trabalho foi gentilmente cedida pela Petrobrás, contendo 73,4% de glicerol. Esta percentagem foi considerada na determinação das quantidades usadas para atingir a concentração de substrato requerida.

##### 4.4.1 Teste de hipótese para seleção da cepa com melhor desempenho

Os grupos de resultados referentes a produção de ácido succínico obtidos para cada cepa bacteriana foram comparados estatisticamente usando Teste de Hipótese. Neste teste, se determina a igualdade ou diferença significativa dos grupos de resultados, tendo como hipótese inicial a igualdade dos grupos de dados (Ho:  $\bar{X}_1 = \bar{X}_2$ ). A aplicação deste teste permite dar validade estatística a seleção da cepa com melhor potencial de produção nas condições avaliadas, e assim dar continuidade ao trabalho experimental.

Primeiro, é verificada a existência ou não de diferenças significativas nas variâncias ( $S^2$ ) dos grupos de dados usando o Teste F-Snedecor. O valor  $F_{calculado}$  se determina a partir das variâncias dos grupos de dados como mostra a seguinte equação:

$$F_{calculado} = \frac{S_M^2}{S_m^2}$$

Onde:

$S_M^2$  : maior variância

$S_m^2$  : menor variância

$F_{calculado}$  sempre  $\geq 1$

A comparação entre os valores de  $F_{\text{calculado}}$  e  $F_{\text{tabelado}}$  permite concluir que:

- Se  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ , não se aceita a igualdade das variâncias
- Se  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ , aceita-se a igualdade das variâncias

Considerando o resultado do Teste F-Snedecor é determinada a forma de calcular o valor de t-Student, tendo:

- Cálculo de t quando as variâncias forem iguais:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|X_1 - X_2|}{S_{ag} \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}; \text{ onde } S_{ag} = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{(n_1+n_2-2)}}$$

Onde:

$X_1$  e  $X_2$ , é a média de cada grupo de dados

$n_1$  e  $n_2$ , é o número de dados de cada grupo

$S_1^2$  e  $S_2^2$ , é a variância de cada grupo de dados

$S_{ag}$ , é o desvio padrão agrupado

- Cálculo de t quando as variâncias forem diferentes:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|X_1 - X_2|}{S_{ag} \sqrt{S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2}}$$

Onde:

$X_1$  e  $X_2$ , é a média de cada grupo de dados

$n_1$  e  $n_2$ , é o número de dados de cada grupo

$S_1^2$  e  $S_2^2$ , é a variância de cada grupo de dados

Finalmente, a comparação entre os valores de  $t_{\text{calculado}}$  e  $t_{\text{tabelado}}$  permite concluir se existe diferença significativa entre as médias dos conjuntos de dados, assim:

- Se  $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$ ,  $H_0$  deve ser rejeitada, as médias são diferentes.
- Se  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ , aceita-se a igualdade das médias.

#### 4.5. Planejamento fatorial fracionado para identificação do efeito dos componentes do meio na produção de ácido succínico

Considerando os 4 componentes identificados inicialmente com influência na produção de ácido succínico por Jaramillo *et al.* (2019), foi conduzido um Planejamento Fatorial Fracionado (PFF) para identificar o tipo de influência e

significância destes componentes em um meio de produção de composição menos complexa, nas condições experimentais próprias deste estudo e usando a cepa bacteriana selecionada. Cada fator foi avaliado em 3 níveis de concentração: alto (+1), baixo (-1) e ponto central (0), tendo como variável resposta a concentração de ácido succínico. No total foram realizados 11 experimentos, mantendo fixas as concentrações de substrato e do agente neutralizante ( $\text{MgCO}_3$ ) em 10 g/L e seguindo as condições operacionais descritas no item 4.3. Na tabela 4.4 se apresentam os fatores e níveis do planejamento PFF. A análise estatística dos resultados foi realizada usando o software *Design-Expert*® 7.0.

**Tabela 4.4** - Fatores e níveis do Planejamento Fatorial Fracionado (PFF) para análise do efeito dos componentes do meio na produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta

Fatores	Níveis (g/L)		
	-1	0	+1
A: Ext. levedura	5,00	10,00	15,00
B: $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,50	4,50	8,50
C: $\text{NaNO}_3$	0,20	1,10	2,00
D: $\text{NaHCO}_3$	2,00	8,50	15,00

#### 4.6 Avaliação combinada de fontes de nitrogênio orgânicas e aceptores de elétrons

Foram desenvolvidos, de forma comparativa e combinada, ensaios para avaliação de três fontes de nitrogênio (extrato de levedura comercial, extrato de levedura residual cervejeira e milhocina) e quatro possíveis aceptores de elétrons (nitrato de sódio, nitrato de amônio, sulfato de sódio e sulfato de amônio). Foi usada uma concentração de 15 g/L para o extrato de levedura e 20,0 g/L para a milhocina, de forma a manter similar conteúdo de nitrogênio. Para os aceptores de elétrons foi usada uma concentração de 0,2 g/L. Os experimentos foram agrupados em quatro blocos, com um total de 16 ensaios, como apresentado na Tabela 4.5, os quais foram realizados por triplicata e segundo condições operacionais descritas no item 4.3.

**Tabela 4.5** - Ensaios para avaliação combinada de fontes de nitrogênio e aceptores de elétrons na produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta

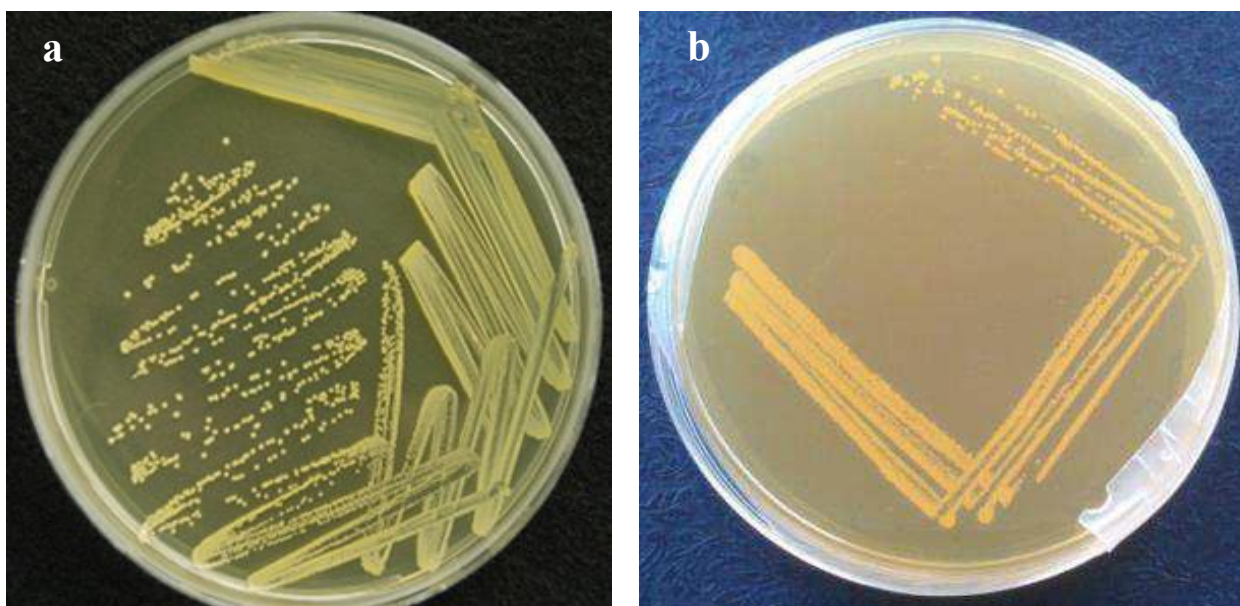
Bloco experimental	Fonte de nitrogênio	Aceptor de eletrons	Ensaio
Bloco I	Extrato de levedura comercial	Sulfato de amônio	1
		Sulfato de sódio	2
		Nitrato de amônio	3
		Nitrato de sódio	4
Bloco II	Milhocina	Sulfato de amônio	5
		Sulfato de sódio	6
		Nitrato de amônio	7
		Nitrato de sódio	8
Bloco III	Extrato de levedura comercial/ milhocina (proporção 50/50)	Sulfato de amônio	9
		Sulfato de sódio	10
		Nitrato de amônio	11
		Nitrato de sódio	12
Bloco IV	Extrato de levedura residual cervejeira	Sulfato de amônio	13
		Sulfato de sódio	14
		Nitrato de amônio	15
		Nitrato de sódio	16

Concentração extrato de levedura comercial e residual: 15 g/L; concentração de milhocina: 22,0 g/L; concentração aceptores de elétron 0,2 g/L

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

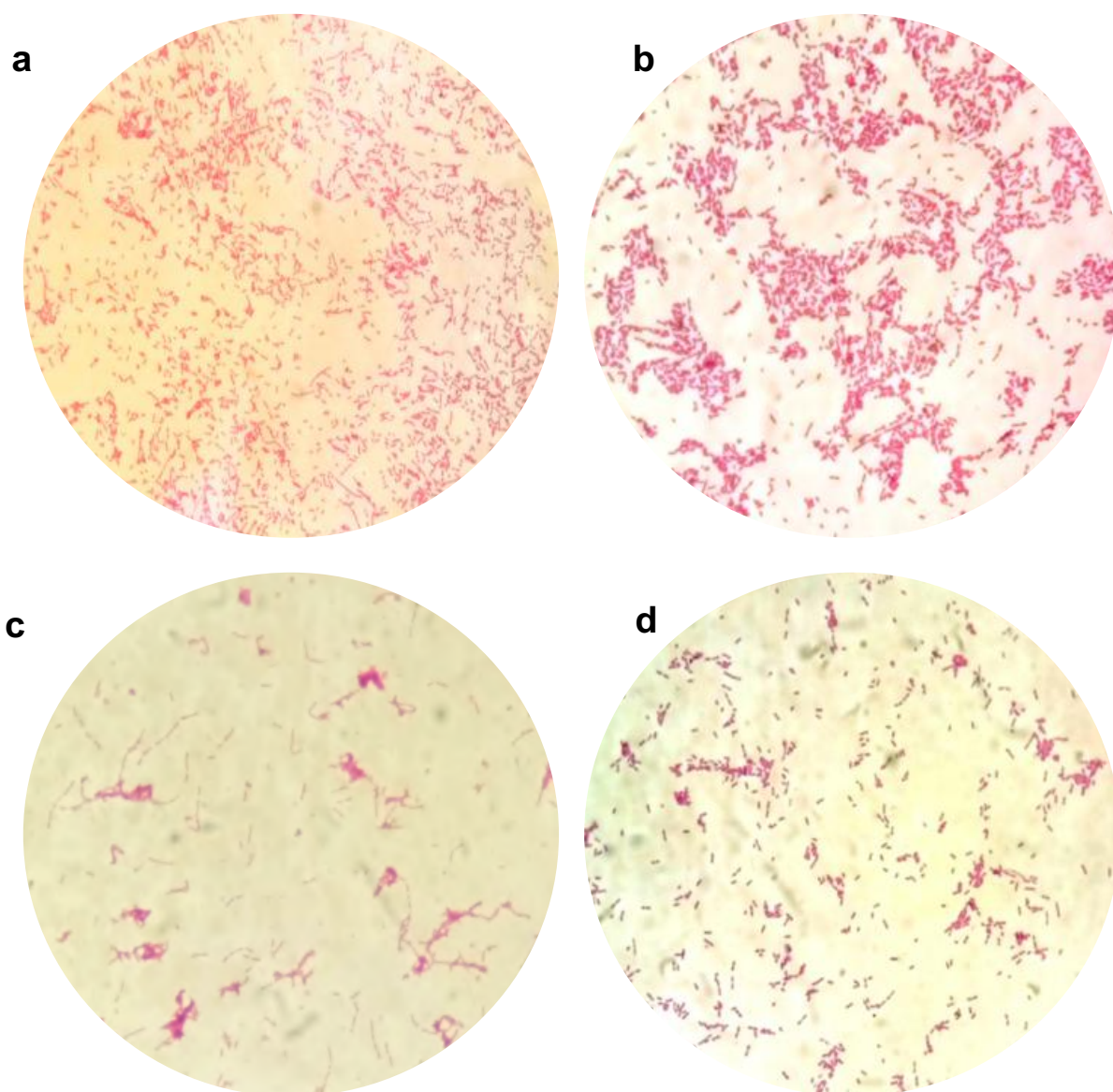
### 5.1 Características morfológicas das cepas bacterianas

Na Figura 5.1 são apresentadas imagens do crescimento de colônias em meio sólido das cepas *Actinobacillus succinogenes* 130Z (a) e *Basfia succiniciproducens* JF4016 (b), após 24 horas de incubação a 37°C. Observa-se que as colônias de ambas as cepas apresentaram características macroscópicas similares, apresentando formato circular com elevação convexa, aspecto úmido, cor branca acinzentada e com diâmetro entre 1,0 e 1,5 mm.



**Figura 5.1** - Crescimento de colônias em meio sólido TSB das cepas *A. succinogenes* 130Z (a) e *B. succiniciproducens* JF4016(b), após 24 h de incubação a 37°C

Entretanto, a análise microscópica de amostras provenientes de cultivos em meio sólido TSB e caldo TSB, as quais foram fixadas em lâminas e coradas pela técnica de Gram, mostraram características morfológicas particulares para as células de cada cepa bacteriana. A Figura 5.2 apresenta imagens microscópicas de cultivos de *B. succiniciproducens* em meio sólido e líquido, após 12 e 24 horas. Nas quatro condições foi observada a pureza dos cultivos, com células Gram negativas, na forma de bacilos pequenos.

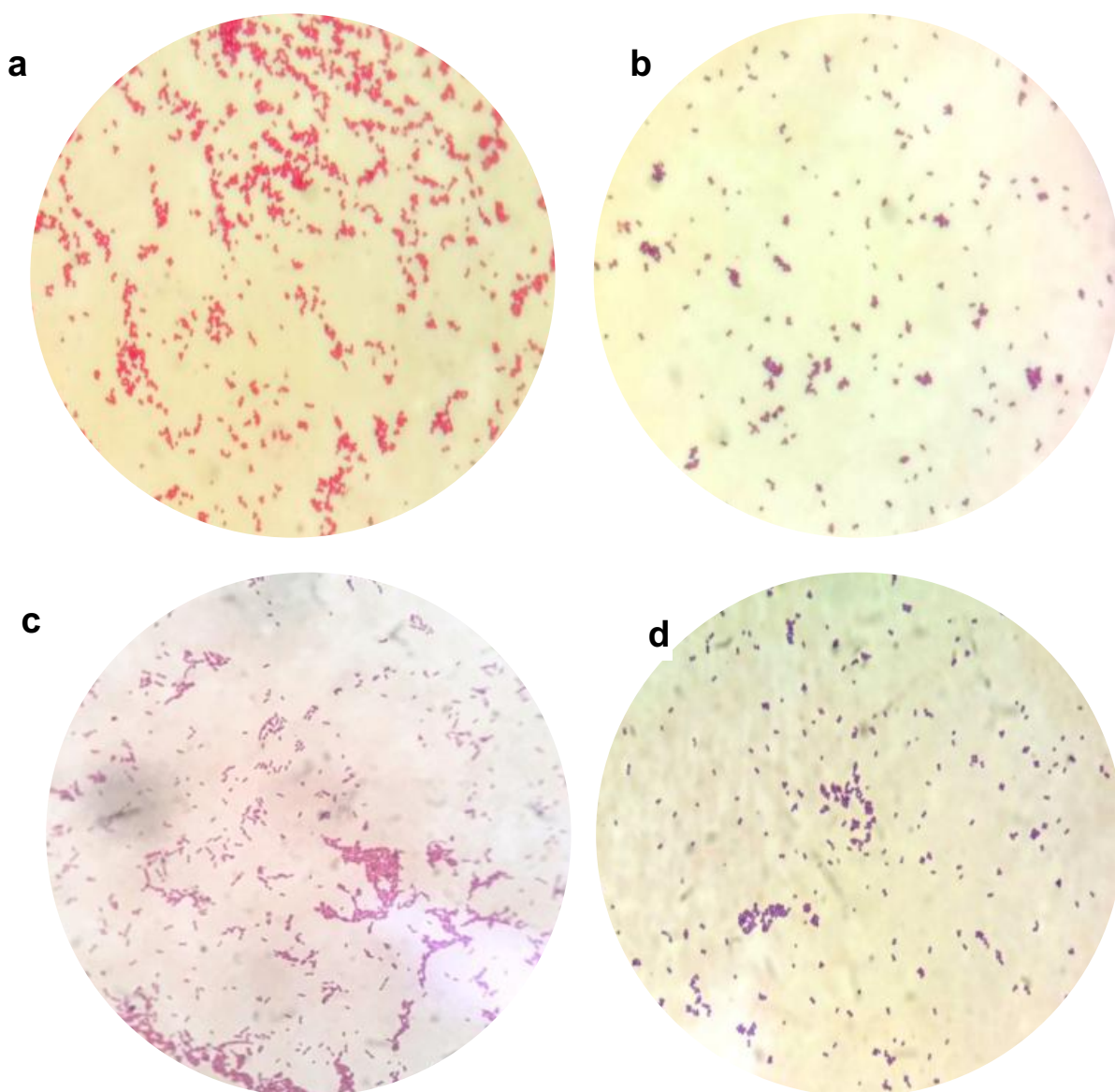


**Figura 5.2** – Imagens microscópicas de cultivos de *B. succiniciproducens* em: (a) meio sólido TSB por 12 horas; (b) meio sólido TSB por 24 horas; (c) caldo TSB por 12 horas; (d) caldo TSB por 24 horas

Para *A. succinogenes*, as observações microscópicas de células crescidas nas quatro condições apresentaram características diferenciadas como é mostrado nas imagens da Figura 5.3. Células cultivadas por 12 horas em meio sólido e líquido se observaram como cocobacilos Gram negativos (Figura 5.3 a; c). No entanto, após 24 horas as células apresentaram alteração da coloração de Gram, sendo observadas como Gram positivas (Figura 5.3 b; d). Apesar da variação na coloração de Gram, verificou-se a pureza dos cultivos, uma vez que não foram observadas



células com características diferentes em relação ao tamanho e coloração de Gram em cada cultivo.



**Figura 5.3** – Imagens microscópicas de cultivos de *A. succinogenes* crescidos em (a) meio sólido TSB por 12 horas; (b) meio sólido TSB por 24 horas; (c) caldo TSB por 12 horas; (d) caldo TSB por 24 horas

A técnica de coloração diferencial de Gram está diretamente relacionada às propriedades estruturais da parede celular das bactérias, o que permite diferenciá-las em dois grupos distintos: Gram positivas e Gram negativas. A parede das bactérias Gram positivas é quase que exclusivamente constituída de uma camada peptidoglicana espessa, o que garante que o complexo iodo-pararosalina (coloração roxa), formado pela interação do cristal violeta com o iodo (primeira e



segunda etapas da técnica, respectivamente), seja retido na parede celular quando as células são tratadas com álcool (terceira etapa da técnica). Por outro lado, por serem as paredes das bactérias Gram negativas constituídas de uma delgada camada de peptidoglicana e membrana externa, a lavagem com álcool resulta na extração do complexo, que pelo tratamento com um contra-corante (fucsina ou safranina) adquirem coloração avermelhada. Porém, existem bactérias que podem apresentar variações quando submetidas à coloração de Gram, uma vez que algumas células Gram-positivas passam a se apresentar como Gram-negativas devido a perdas do conteúdo de peptidoglicana da parede celular. A literatura ainda apresenta relatos de que durante o envelhecimento das células Gram-negativas pode haver excreção de enzimas, o que resulta em degradação de lipoproteínas da membrana celular e da parede celular, levando à alteração da permeabilidade da parede celular pela ação do álcool; que, neste caso, passam a se apresentar como Gram-positivas como observado nas células de *A. succinogenes* (BEVERIDGE, 1990).

## **5.2 Avaliação da capacidade das cepas *Actinobacillus succinogenes* e *Basfia succiniciproducens* para a produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta**

Na tabela 5.1 foram compilados os dados da fermentação de glicerina bruta, como fonte de substrato, pelas cepas *A. succinogenes* 130Z e *B. succiniciproducens* JF4016. Nesta tabela também se apresenta o resultado do teste de hipótese para comparação dos conjuntos de dados obtidos para cada cepa.

**Tabela 5.1** - Comparação estatística da produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta por *Actinobacillus succinogenes* 130Z e *Basfia succiniciproducens* JF4016, após 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO<sub>2</sub>

Ensaio	Concentração de ácido succínico (mg/L)	media	S	Produtividade media (mg/L/h)	Variância	F cal	F tab	t cal	t tab
Ac-1	800,95	769,57	38,84	64,13	1508,39	5,831	5,050	12,655	2,365
Ac-2	817,89								
Ac-3	774,73								
Ac-4	753,68								
Ac-5	763,09								
Ac-6	707,11								
Ba-1	1215,18	1293,99	93,78	107,83	8794,85	5,831	5,050	12,655	2,365
Ba-2	1313,86								
Ba-3	1182,59								
Ba-4	1298,34								
Ba-5	1302,29								
Ba-6	1451,69								

Ac: *Actinobacillus succinogenes* 130Z; Ba: *Basfia succiniciproducens* JF4016

Como indicado na Tabela 5.1, as fermentações de glicerina bruta por *Actinobacillus succinogenes* 130Z resultaram em produções de ácido succínico entre 707,1 e 817,9 mg/L, correspondendo ao valor médio de 768,6 mg/L. Para *Basfia succiniciproducens* JF4016, a produção de ácido succínico variou de 1182,6 a 1451,7 mg/L, com produção média de 1294,0 mg/L. Portanto, a cepa *B. succiniciproducens* empregada foi a mais eficiente, uma vez que foi alcançado 40% a mais de ácido succínico. No entanto, ambas as cepas bacterianas apresentaram concentrações de ácido succínico superiores as concentrações de 490 mg/L e 360 mg/L reportadas por Barros *et al.* (2013) e Carvalho *et al.* (2014), respectivamente, para fermentações de glicerol por *Actinobacillus succinogenes* em condições anaeróbias.

A análise estatística dos conjuntos de resultados mostrou que os grupos de dados referentes a cada cepa apresentaram variâncias diferentes ( $F_{cal} > F_{tab}$ ), indicando diferenças no comportamento dos conjuntos de dados. As produções de ácido succínico obtidas por *A. succinogenes* 130Z e *B. succiniciproducens* JF4016 apresentaram diferenças significativas ( $t_{cal} > t_{tab}$ ), o que pode ser interpretado como a existência de características metabólicas significativamente diferentes para cada bactéria. Assim, foi possível indicar com validade estatística que nas condições experimentais avaliadas, a cepa *B. succiniciproducens* JF4016 apresentou melhor

potencial para produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta, com uma produção média 1,7 vezes maior a obtida por *Actinobacillus succinogenes* 130Z.

A maior produção de ácido succínico obtida por *B. succiniciproducens* pode estar associada a uma maior capacidade natural para assimilação de moléculas de glicerol e/ou uma maior capacidade de carboxilação do PEP. Com relação à capacidade de assimilação de moléculas de glicerol, Schindler *et al.* (2014) tem indicado que bactérias anaeróbias podem assimilar este substrato por duas alternativas metabólicas que levam a formação de DHAP, conforme descrito na seção de revisão bibliográfica. Para a bactéria *A. succinogenes*, a assimilação de glicerol é realizada exclusivamente mediante a síntese de glicerol 3-fosfato, seguida da formação de dihidroxiacetona fosfato (DHAP), com a geração de equivalentes redutores, que por não serem naturalmente reciclados, podem interferir no consumo de substrato e consequentemente limitar a síntese de produtos. No caso de *B. succiniciproducens*, a literatura não provê ainda informação detalhada. É possível considerar que o consumo de glicerol também possa ser realizado paralelamente através da formação de dihidroxiacetona (DHA) como intermediário para formação de dihidroxiacetona fosfato (DHAP), tendo assim uma maior capacidade natural para assimilação de glicerol, refletindo em maior síntese de produtos.

Além da capacidade de assimilação do substrato, a produção de ácido succínico requer o direcionamento da rota metabólica, o que se dá pela carboxilação do fosfoenol piruvato (PEP). A carboxilação se dá em um ambiente rico em CO<sub>2</sub> pela ação das enzimas PEP carboxiquinase e PEP carboxilase (LANGE *et al.*, 2017). Logo, a maior produção de ácido succínico a partir de glicerina por *B. succiniciproducens* JF4016 pode sugerir uma maior capacidade de carboxilação relacionada à atividade conjunta das duas enzimas PEP carboxilantes, enquanto que tão somente a enzima PEP carboxiquinase tem ação no metabolismo de *A. succinogenes* 130Z, como já reportado por alguns autores (BECKER *et al.*, 2013; PATERAKI *et al.*, 2016). Embora os valores de ácido succínico obtidos nestes primeiros ensaios estão em concordância com concentrações reportadas por Barros *et al.* (2013) e Carvalho *et al.* (2014), a produção limitada de ácido succínico pode estar associada a uma ineficiente dissolução do CO<sub>2</sub> no meio de produção, com possível produção de ácido carbônico

pela reação do CO<sub>2</sub> com o meio aquoso, ocasionando uma baixa carboxilação (TAN *et al.*, 2018).

Os dados obtidos permitiram uma comparação estatística e metabólica das cepas bacterianas, confirmando o maior aproveitamento de glicerina bruta para produção de ácido succínico por *B. succiniciproducens*, com uma produtividade estimada de 107,8 mg/L. Similares valores deste parâmetro fermentativo foram relatados por outros autores por cepas naturais e inclusive, cepas geneticamente modificadas para cultivos com glicerol. Por exemplo, Bretz *et al.* (2015) indicaram produtividade de 87 mg/L.h para *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, enquanto Choi *et al* (2016) determinaram 130 mg/L.h pelo cultivo de cepa modificada de *M. succiniciproducens*. Porém, Yuzbashev *et al.* (2010) alcançaram 270 mg/L.h pelo uso de uma cepa recombinante da levedura *Y. lipolytica*.

### **5.3 Efeito dos componentes do meio de fermentação na produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta por *Basfia succiniciproducens***

Na Tabela 5.2 são apresentados os resultados referentes à produção de ácido succínico pela cepa *B. succiniciproducens* JF4016 para planejamento Fatorial Fracionado, onde foram consideradas como variáveis o extrato de levedura (A), o fosfato de sódio monobásico (B), o nitrato de sódio (C) e o bicarbonato de sódio (D), mantendo fixas as quantidades de substrato e do agente neutralizante. As concentrações de ácido succínico variaram de 1064,9 mg/L a 2582,8 mg/L, ou seja, a produção de ácido succínico foi fortemente influenciada pelos fatores nutricionais testados, permitindo alcançar um aumento de até 99,6% em relação ao valor médio obtido nas fermentações anteriores (Tabela 5.1).

**Tabela 5.2** – Valores resultantes do Planejamento Fatorial Fracionado para produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta por *B. succiniciproducens* JF4016 para 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO<sub>2</sub>

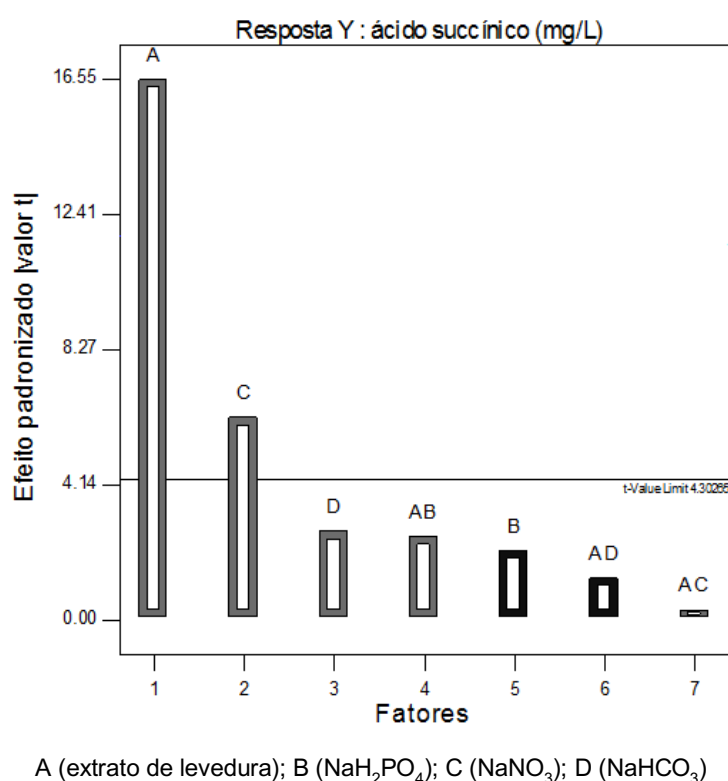
Ensaio	A	B	C	D	Ác. Succínico (mg/L)
1	-1	-1	-1	-1	1064,90 ± 36,49
2	1	-1	-1	1	2132,45 ± 82,97
3	-1	1	-1	1	1021,62 ± 17,37
4	1	1	-1	-1	2067,42 ± 52,42
5	-1	-1	1	1	1707,87 ± 41,44
6	1	-1	1	-1	2461,12 ± 15,47
7	-1	1	1	-1	1146,49 ± 98,70
8	1	1	1	1	2582,85 ± 48,94
9	0	0	0	0	2010,47 ± 40,67
10	0	0	0	0	1862,36 ± 65,12
11	0	0	0	0	2030,79 ± 24,65

Níveis para cada fator: A (extrato de levedura) 5,0-10,0-15,0 g/L; B (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,5-4,5-8,5 g/L; C (NaNO<sub>3</sub>) 0,2-1,1-2,0 g/L; D (NaHCO<sub>3</sub>) 2,0-8,5-15,0 g/L. Com concentração fixa de substrato e MgCO<sub>3</sub> em 10,0 g/L e vazão de CO<sub>2</sub> 0,5 L/min.

A Figura 5.4 apresenta o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para os fatores extrato de levedura (A), fosfato monobásico de potássio (B), nitrato de sódio (C) e bicarbonato de sódio (D), individualmente e combinados, na síntese de ácido succínico pela cepa JF4016. A ordem de influência dos componentes foi A > C > D > AB > B > AD > AC, onde A, C, D, AB e AC apresentaram um efeito positivo, enquanto B e AD tiveram um efeito negativo. Nota-se ainda que os componentes (A) e (C) apresentaram efeito significativo em um nível de confiança de 95%, indicando que nas condições avaliadas, altas concentrações destes componentes beneficiou a produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta.

O extrato de levedura (A) mostrou-se como o fator com maior efeito, sendo essencial para o metabolismo de *B. succiniciproducens* JF4016, resultando em maior quantidade de ácido succínico produzido. Efeito similar foi observado para *A. succinogenes* por Shen *et al.* (2014) em cultivo contendo glicose como fonte de carbono, e por Barros *et al.* (2013) usando glicerol. Jae *et al.* (2009) também indicaram a importância do extrato de levedura para a produção de ácido succínico por *M. succininiproducens*. O efeito positivo do extrato de levedura também tem sido observado em outros processos microbiológicos, usando *Rhodobacter sphaeroides* e *Bacteroides ruminicola* (HAKOBYAN *et al.*, 2012; SAXENA *et al.*, 2017). O efeito tão relevante do extrato de levedura se deve às suas características nutricionais, pois além de ser uma fonte de nitrogênio básica, contendo

aminoácidos não essenciais e essenciais, particularmente rica em lisina, contém vitaminas do complexo B que atuam como cofatores de enzimas, e ainda sais e elementos traços que contribuem em diferentes aspectos metabólicos (CABALLERO-CÓRDOBA; PACHECO; SGARBIERI, 1997; JARAMILLO *et al.*, 2018).



**Figura 5.4** - Diagrama de Pareto para o efeito dos componentes do meio na produção de ácido succínico a partir da glicerina bruta por *B. succiniciproducens* JF4016 para 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO<sub>2</sub>. ■ Efeito positivo; ■ Efeito negativo;  $\alpha = 0,05$

O nitrato de sódio (C), além de prover nitrogênio, elemento essencial para as funções vitais de todos os seres vivos, também está relacionado com seu papel comoceptor de elétrons, fazendo o reciclo de equivalentes redutores para regeneração de FADH<sub>2</sub> a FAD durante a formação de DHAP, contribuindo para a assimilação do substrato e consequentemente para formação de PEP, o qual é intermediário da rota metabólica (SCHINDLER *et al.*, 2014).

Distintamente, o fosfato de sódio monobásico (B) e o bicarbonato de sódio (D) não mostraram efeitos significativos. O efeito negativo não significativo do fosfato de sódio (B) pode estar relacionado à sua presença em sais na glicerina, em quantidades suficientes para suprir os requisitos nutricionais da cepa

microbiana (SAMUL *et al.*, 2014); sem a necessidade de adição de uma fonte externa. Por outro lado, elevadas concentrações de sais podem ter efeito negativo, ao ocasionar alterações no equilíbrio osmótico e no transporte de nutrientes pela membrana celular (CHATZIFRAGKOU *et al.* 2010). De forma similar, autores como Zhu *et al.* (2014), Shen *et al.* (2014) e Jeon *et al.* (2013) tem reportado o efeito negativo de sais na produção de ácido succínico a partir de açúcares.

O bicarbonato de sódio (D) foi usado considerando seu papel como fonte indireta de CO<sub>2</sub>, podendo influenciar a atividade das enzimas carboxilantes. Contudo, este componente não apresentou significância devido a injeção de CO<sub>2</sub> gasoso e da presença de carbonato de magnésio como agente neutralizante e fonte indireta de CO<sub>2</sub>, os quais forneceram os íons HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> necessários para atividade das enzimas carboxilantes do PEP (MCKINLAY e VIEILLE, 2008; DESSIE *et al.*, 2018). De forma similar, Jeon *et al.* (2013) indicaram a não significância do bicarbonato de sódio na produção de ácido succínico por *C. glutamicum* a partir de glicose.

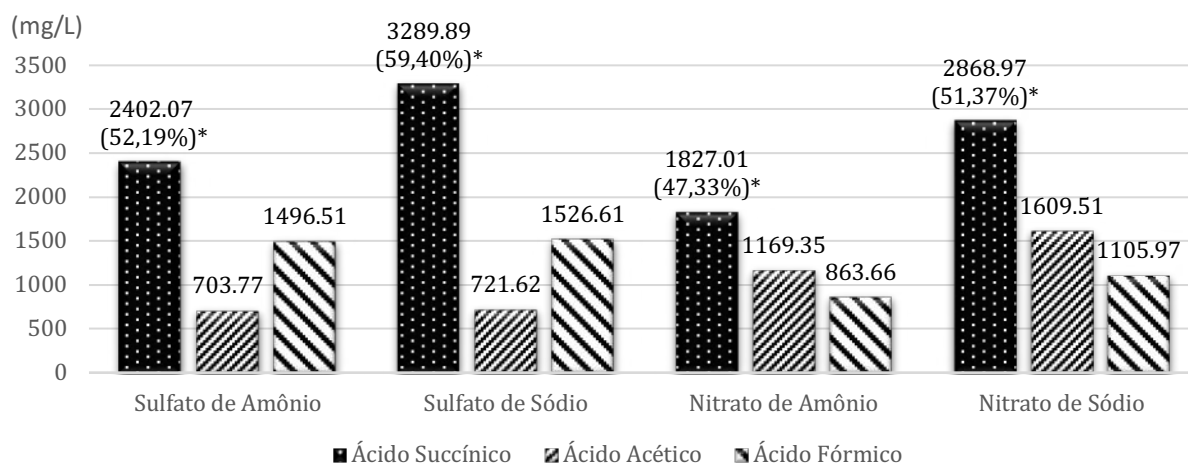
#### **5.4 Avaliação combinada de fontes de nitrogênio orgânicas e aceptores de elétrons na produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta por *Basfia succiniciproducens***

Considerando os efeitos significativos observados no PFF para a fonte de nitrogênio e o acceptor de elétrons, foi realizada uma avaliação combinada do uso de três fontes orgânicas de nitrogênio (extrato de levedura comercial, milhocina e extrato de levedura residual cervejeira) e quatro sais inorgânicos como aceptores de elétrons (nitrato de sódio, nitrato de amônio, sulfato de sódio e sulfato de amônio). Os resultados serão apresentados em conjuntos segundo a fonte de nitrogênio avaliada.

##### **5.4.1 Avaliação de aceptores de elétrons utilizando extrato de levedura comercial como fonte de nitrogênio**

Na Figura 5.5 são apresentados os resultados correspondentes aos principais metabólitos gerados por *Basfia succiniciproducens* JF4016 a partir da fermentação de glicerina bruta suplementada com extrato de levedura de modo a

atender as necessidades de carbono e nitrogênio da bactéria. É possível identificar a influência de cada um dos aceptores de elétrons avaliados na produção do ácido succínico, bem como na co-geração dos ácidos acético e fórmico, embora sejam mais acentuadas as diferenças no perfil dos metabólitos oriundos do desvio metabólico C3.



\*Porcentagem referente a produção de ácido succínico em relação a concentração total de metabólitos produzidos.

**Figura 5.5** – Produção de metabólitos a partir glicerina bruta por *B. succiniciproducens* JF4016 para 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO<sub>2</sub>, usando extrato de levedura comercial como fonte de nitrogênio e diferentes aceptores de elétrons

A análise da Figura 5.5 permite ainda apontar o ácido succínico como principal metabólito produzido, independentemente do acceptor final de elétrons testado, embora seja evidente a forte influência destes na quantidade de ácido succínico produzida, que variou de 1827,0 a 3289,9 mg/L, obtidos para nitrato de amônio e sulfato de sódio, respectivamente. Mesmo assim, todas as condições testadas resultaram em concentrações do ácido succínico superiores ao valor inicialmente obtido para o cultivo da cepa em meio nutricionalmente mais fortificado e sem acceptor final de elétrons, quando foi alcançado 1294,0 mg/L (Tabela 5.1). O aumento observado, de pelo menos 41% comprovam ser imprescindível definir qual o acceptor final de elétrons mais adequado para indução da síntese de ácido succínico no contexto do agente microbiano, composição do meio de produção e condições operacionais. Também sugere a presença das enzimas nitrato redutase e sulfato redutase no metabolismo *B. succiniciproducens*, permitindo assim o uso nitratos e sulfatos como aceptores de elétrons para assimilação de moléculas de glicerol.



Como já mencionado, a maior concentração de ácido succínico foi obtida usando sulfato de sódio, de aproximadamente 3300 mg/L, equivalendo a quase 60 % dos metabólitos quantificados. Por sua vez, o emprego do nitrato de sódio resultou na segunda maior quantidade produzida de ácido succínico, de quase 3000 mg/L, e correspondente a pouco mais de 50 % do somatório dos ácidos orgânicos analisados.

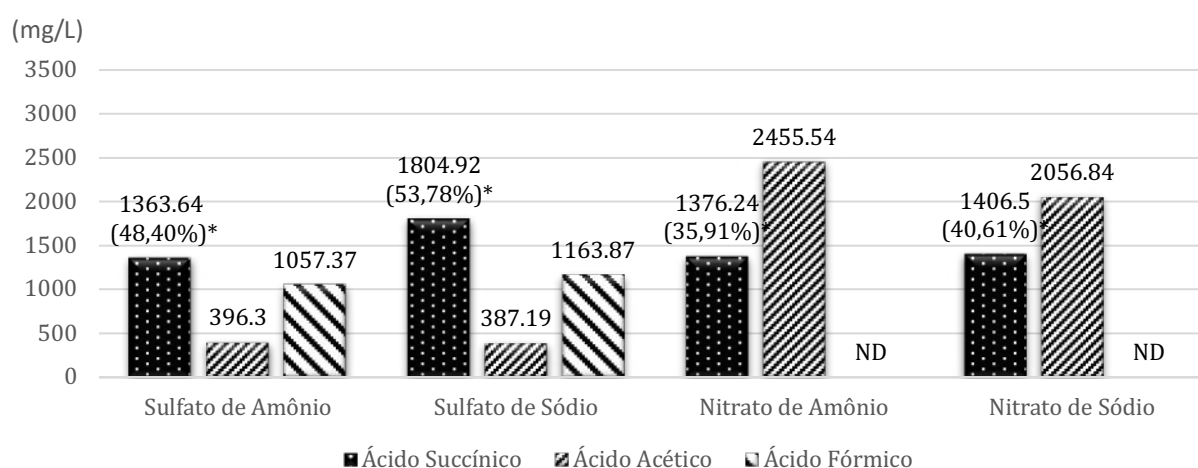
A cogeração de ácido acético e ácido fórmico também foi fortemente influenciada pelo aceptor final de elétrons. O emprego dos sais de nitrato resultou na formação de ácido acético como principal coproduto, enquanto o ácido fórmico foi preferencialmente produzido nos cultivos com sais de sulfato. Os maiores valores de 1609,5 mg/L de ácido acético foram alcançados para nitrato de amônio e cerca de 1500 mg/L de ácido fórmico quando usados os sais de sulfato.

#### 5.4.2 Avaliação de aceptores de elétrons utilizando milhocina como fonte de nitrogênio

Na Figura 5.6 se apresenta a produção de metabólitos provenientes da fermentação de glicerina bruta por *B. succiniciproducens* utilizando a milhocina como fonte de nitrogênio, e quatro distintos aceptores de elétrons. Analisando a figura, pode-se observar que o perfil de ácidos orgânicos obtidos foi bem diferenciado do obtido empregando extrato de levedura comercial como fonte de nitrogênio. A produção de ácido succínico variou entre 1363,64 e 1804,92 mg/L. Portanto, houve um decréscimo do rendimento de ácido succínico ao alcançado quando empregado o extrato de levedura comercial e diferentes aceptores de elétrons, apesar do valor máximo ser 39% superior ao obtido para a fermentação da glicerina no meio nutricionalmente mais rico (Tabela 5.1).

Além disso, a análise da Figura 5.6, permite evidenciar diferenças no perfil de produção dos ácidos orgânicos em função do aceptor final de elétrons. Com a milhocina, os sais de sulfato propiciaram as maiores produções de ácido succínico seguida da geração de ácido fórmico como principal coproduto, embora em quantidades menores das obtidas pelo emprego de extrato de levedura comercial, mas em proporções semelhantes (Fig. 5.5). Os valores máximos de concentração e proporção de ácido succínico foram alcançados com sulfato de sódio, 1804,9 mg/L e 53,8% do total de ácidos orgânicos quantificados. A produção de ácido

succínico foi seguida pelos ácidos fórmico e acético, similarmente ao observado quando a fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura comercial (Tabela 5.5). Contrariamente, o uso de nitratos em conjunto com a milhocina, resultou em favorecimento da biossíntese de ácido acético sem detecção de ácido fórmico, e inibição parcial da formação de ácido succínico. Logo, o perfil de produção de metabólitos usando nitratos sugere que o uso de milhocina em conjunto com nitratos favorece fortemente o desvio C3, tendo o ácido acético como principal produto.



\*Percentagem referente a concentração de ácido succínico em relação a a concentração total de metabólitos produzidos; ND: não detectado

**Figura 5.6** – Produção de metabólitos a partir glicerina bruta por *B. succiniciproducens* para 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO<sub>2</sub>, usando milhocina como fonte de nitrogênio e diferentes aceptores de elétrons

Em suma, os dados obtidos com milhocina (Fig. 5.6) em comparação ao bloco de fermentações usando extrato de levedura comercial (Fig. 5.5), mostra que o ácido succínico só foi preferencialmente produzido com o uso de sulfato de sódio. Porém, nesta condição, a quantidade de ácido succínico foi em torno de 45% inferior em relação a combinação extrato de levedura comercial e sulfato de sódio.

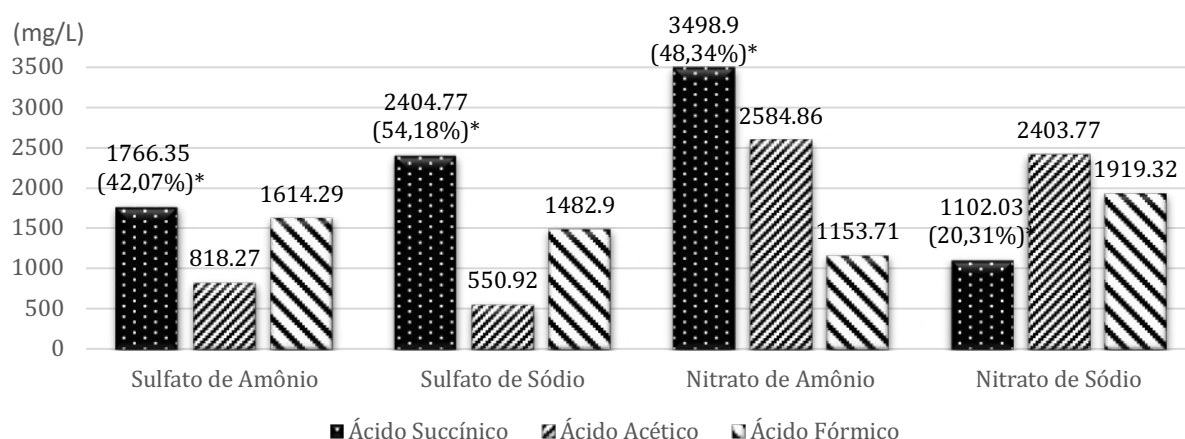
Basicamente, a milhocina, o subproduto agroindustrial proveniente do processamento do milho, apresenta uma composição, com exceção dos ácidos orgânicos, nutricionalmente semelhante à do extrato de levedura (SONG *et al.*, 2008; PODKOVYROV e ZEIKUS, 1993). Contudo, a presença dos ácidos láctico e glicólico, junto ao maior conteúdo de ferro na milhocina podem interferir na atividade metabólica de *B. succiniciproducens* (HULL *et al.*, 1996). Portanto, ratifica-se a

importância de fazer um estudo acima da fonte de nitrogênio em conjunto com o aceptor de elétrons na atividade bioquímica da cepa *B. succiniciproducens* e, por conseguinte, na biossíntese de ácido succínico.

Lee *et al.* (2003) observaram, para a fermentação meio à base de lactose fortificado com milhocina por *M. succiniciproducens*, quedas entre 3-12% na produção de ácido succínico em relação ao uso de quantidades semelhantes de extrato de levedura, confirmando os resultados obtidos no presente estudo. Por outro lado, Tan *et al.* (2016) indicaram o incremento da produção de ácido fórmico em fermentações por *Actinobacillus succinogenes* usando milhocina em comparação ao extrato de levedura. Este metabólito não foi detectado nas fermentações usando nitratos como aceptores de elétrons (Fig. 5.6). Entretanto, se observou um incremento na produção de ácido acético. Schindler *et al.* (2014) observaram que o aumento da concentração de nitrato favoreceu a síntese ácido acético por *A. succinogenes* usando extrato de levedura como fonte de nitrogênio, algo similar ao observado usando milhocina. Desta forma, tem-se uma complexidade bioquímica relacionada à interação da fonte de nitrogênio e do aceptor de elétrons no metabolismo de *B. succiniciproducens* no aproveitamento de glicerina bruta.

#### 5.4.3 Avaliação de aceptores de elétrons utilizando a mistura extrato de levedura comercial e milhocina (50/50) como fonte de nitrogênio

Os resultados obtidos na fermentação da mistura de extrato de levedura comercial e milhocina na proporção 50/50, para avaliação do efeito de distintos aceptores de elétrons são apresentados na Figura 5.7. Nas condições experimentais avaliadas, a produção de ácido succínico esteve na faixa de 1102,0 e 3498,9 mg/L, superando a concentração média obtida nas fermentações iniciais (Tabela 5.1) e a faixa de resposta do PFF.



\*Percentagem referente a concentração de ácido succínico em relação a concentração total de metabólitos produzidos; ND: não detectado

**Figura 5.7** – Produção de metabólitos a partir glicerina bruta por *B. succiniciproducens* para 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO<sub>2</sub>, usando extrato de levedura comercial e milhocina na proporção 50/50 como fonte de nitrogênio e diferentes aceptores de elétrons

O emprego de sulfatos como aceptores de elétrons resultou em perfil de produção de ácidos orgânicos análogo ao obtido para as fermentações de glicerina bruta com extrato de levedura comercial ou com milhocina de forma independente. E, tal qual evidenciado anteriormente, dentre os sais de sulfato, o de sódio foi mais efetivo na biossíntese de ácido succínico. Mesmo assim, a produção de ácido succínico (2407,7 mg/L) e a proporção dele na quantidade global de ácidos orgânicos produzidos (54,2 %) foram inferiores em comparação ao uso exclusivo do extrato de levedura comercial.

No entanto, o perfil de ácidos orgânicos coproduzidos com os sais de nitrato foi bem distinto em comparação aos sais de sulfato (Fig. 5.7) e, inclusive, aos determinados a partir do uso individual das fontes de nitrogênio. O emprego de nitrato de amônio promoveu o aumento da produção dos três metabólitos (ácido succínico, acético e fórmico), mantendo um perfil semelhante ao obtido com emprego apenas de extrato de levedura comercial (Fig. 5.5). Apesar de se alcançar a maior concentração com o nitrato de amônio, o percentual de ácido succínico com relação ao somatório dos ácidos orgânicos produzidos, equivalente à 48,3% (Figura 5.7). Já com o nitrato de sódio, a rota C3 foi amplamente favorecida, com produção superior de ácido fórmico, e sobretudo de ácido acético, evidenciando a menor produção de ácido succínico, correspondendo a apenas 20,3% dos produtos quantificados.

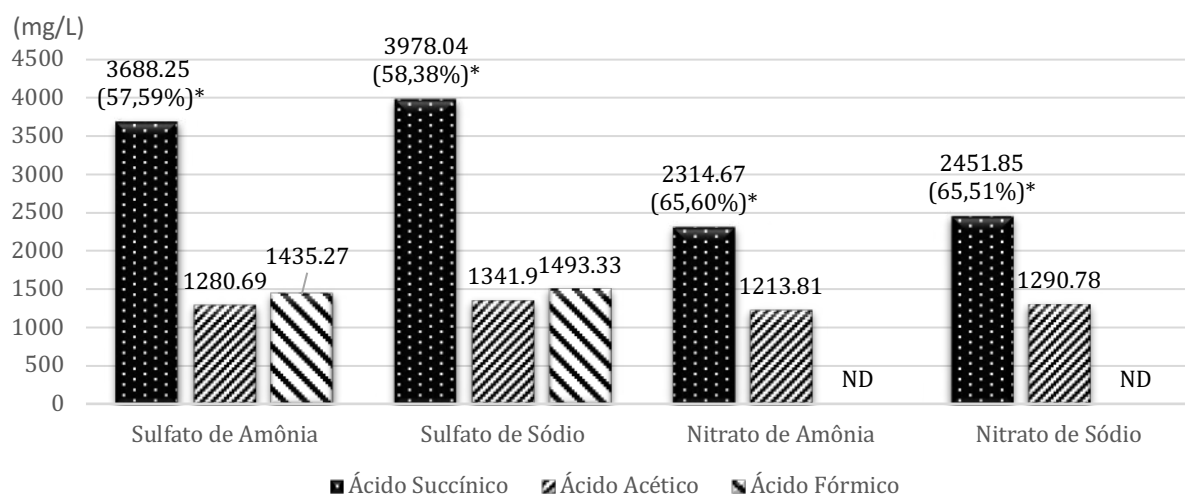
Aparentemente, o uso de milhocina para substituição total ou parcial do extrato de levedura comercial não é apropriado para a biossíntese de ácido succínico por *B. succinoproducens* JF4016. Entretanto, o uso combinado das fontes de nitrogênio com menores concentrações da milhocina poderia ser avaliado, adotando-se o sulfato de sódio comoceptor final de elétrons, em condições operacionais que permitam aumentar a eficiência da carboxilação do PEP por *B. succiniciproducens*.

#### 5.4.4 Avaliação de aceptores de elétrons utilizando levedura residual cervejeira como fonte de nitrogênio

Na figura 5.8 é apresentada a produção dos metabólitos ácidos produzidos a partir da fermentação de glicerina bruta, usando extrato de levedura residual cervejeira e aceptores de elétrons inorgânicos. De forma geral, a produção de ácido succínico variou entre 2314,67 e 3978,04 mg/L. Os valores obtidos são superiores às produções de ácido succínico nos ensaios realizados com extrato de levedura comercial (Figura 5.5). O perfil de produção de ácidos orgânicos, como ilustra a Figura 5.8, mostra serem as maiores concentrações de ácido succínico relativas ao emprego de sais de sulfato como aceptores de elétrons, correspondendo em torno de 58% dos produtos quantificados, enquanto proporções equivalentes dos ácido acético e fórmico contemplaram os 42 % restantes. No entanto, houve menor biossíntese de ácido succínico quando sais de nitrato foram providos às fermentações de glicerina bruta com a levedura cervejeira residual. Porém, não houve detecção de ácido fórmico, elevando a proporção de ácido succínico no meio reacional para 65%. Essa resposta foi contrária ao observado com o extrato comercial, mas similar ao ocorrido com a milhocina (Fig. 5.6), pelo que é possível pensar que impurezas presentes na levedura residual, tenham algum tipo de interação com os nitratos limitando a formação de ácido fórmico no desvio metabólico C3.

De forma comparativa com os ensaios usando extrato de levedura comercial (Fig. 5.5), as fermentações usando extrato de levedura residual cervejeira (Fig 5.8) mostraram melhores produções de ácido succínico. Isto pode estar relacionado com as características do resíduo usado, uma vez que o extrato de levedura residual apresenta na sua composição carboidratos, incluindo glicose, os quais são

utilizados como cosubstratos pela *B. succiniciproducens* levando ao aumento dos metabólitos produzidos (SAKSINCHAI *et al.*, 2001; MATHIAS, 2015; SOUZA, 2016).



\*Percentagem referente a concentração de ácido succínico em relação a concentração total de metabólitos produzidos; ND: não detectado

**Figura 5.8** – Produção de metabólitos a partir glicerina bruta por *B. succiniciproducens* após 12 horas de fermentação com suprimento direto de CO<sub>2</sub>, usando levedura residual como fonte de nitrogênio e diferentes aceptores de elétrons

## 6 CONCLUSÕES

A análise morfológica de cultivos em meios líquidos e sólidos ratificaram serem as células da cepa *Actinobacillus succinogenes* 130Z cocobacilos Gram variáveis enquanto que para as células da cepa *Basfia succinoproducens* JF4016 revelou a presença de pequenos bastonetes Gram-negativos;

Nas condições experimentais avaliadas, a análise estatística dos resultados permitiu confirmar que a cepa *B. succiniciproducens* teve uma melhor capacidade de produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta comparada com *A. succinogenes*;

Os resultados do planejamento fatorial fracionado mostraram mudanças na produção de ácido succínico em função dos fatores nutricionais, indicando o efeito positivo e significativo da fonte de nitrogênio orgânica (extrato de levedura comercial) e do aceptor de elétrons (nitrato de sódio) na produção de ácido succínico a partir de glicerina bruta, enquanto o fosfato de sódio monobásico apresentou efeito negativo e não significativo;

Comparativamente, as fontes de nitrogênio testadas apresentaram comportamento bacteriano distinto, aparente nos perfis diferenciados dos ácidos orgânicos produzidos. Ademais, foram vistas maiores concentrações de ácido succínico utilizando levedura residual e extrato de levedura comercial quando comparadas a milhocina, com diferenças na produção de mais de 45%. A levedura cervejeira residual acrescentou em 20,9% a produção obtida pelo extrato de levedura comercial, correspondendo ao valor máximo do bioproduto de 3978,04 mg/L e 65,6% dos produtos quantificados. Enquanto que a mistura (50:50) foi a que apresentou uma menor produção de ácido succínico em percentagem de bioprodutos, de 20,32% correspondendo a 1102,03 mg/L.

Dentre os sais testados como aceptores finais de elétrons finais – nitrato de sódio, nitrato de amônio, sulfato de sódio e sulfato de amônio –, o sulfato de sódio teve uma maior produção de ácido succínico para o extrato de levedura, milhocina e levedura residual. Para a levedura residual, no entanto, quem obteve uma maior proporção com relação aos ácidos produzidos foram os nitratos, em torno de 65%.

Os resultados produzidos sugerem o uso de levedura residual como fonte de nitrogênio para a produção de ácido succínico, e o uso de sais de sulfato como aceptores de elétrons, destacando o sulfato de sódio.

Por fim, os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados comprovam a eficácia da utilização da glicerina bruta como substrato, sem nenhum tratamento prévio, o que contribui para garantir a sustentabilidade da produção nacional de biodiesel, além de minimizar impactos ao meio ambiente. No entanto, a consolidação da produção biotecnológica do ácido succínico a partir do principal resíduo das plantas de biodiesel requer a otimização das condições nutricionais e operacionais.



## 7 REFERÊNCIAS

AHN, Jung Ho; JANG, Yu-Sin; LEE, Sang Yup. **Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms**. Current opinion in biotechnology, v. 42, p. 54-66, 2016.

Akhtar M, Lentz MJ, Blanchette RA, Kirk TK.1997. **Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping**. Tappi J. 80(6):161-164.

AMBAR BALTICO BRASIL, <https://www.ambarbalticobrasil.com.br>. Acessado, agosto 2020.

AMPELLI, C; PERATHONER, S; CENTI, G. **CO<sub>2</sub> utilization: an enabling element to move to a resource and energy efficient chemical and fuel production**. Philosophical Transactions A. The Royal Society Publishing. 2015.

ANITHA, M.; KAMARUDIN, Siti Kartom; KOFLI, Noorhisham Tan. **The potential of glycerol as a value-added commodity**. Chemical Engineering Journal, v. 295, p. 119-130, 2016.

BABAEI, Mahsa *et al.* **Valorization of organic waste with simultaneous biogas upgrading for the production of succinic acid**. Biochemical engineering journal, v. 147, p. 136-145, 2019.

BABAJIDE, Omotola. **Sustaining biodiesel production via value-added applications of glycerol**. Journal of Energy, v. 2013, 2013.

BARROS. M.; FREITAS. S.; PADILHA. G.S.; ALEGRE. R.M. **Biotechnological production of succinic acid by Actinobacillus succinogenes using different substrates**. Chemical Engineering Transactions. 2013, v. 32, p. 985-990.

BEAUPREZ, Joeri J.; DE MEY, Marjan; SOETAERT, Wim K. **Microbial succinic acid production: natural versus metabolic engineered producers**. Process Biochemistry, v. 45, n. 7, p. 1103-1114, 2010

BEVERIDGE, T.J. **Mechanism of Gram Variability in Select Bacteria** J. Bacteriol. 1990. 172(3):1609- 1620.

BRETZ. K. **Succinic acid production in fed-batch fermentation of Anaerobiospirillum succiniciproducens using glycerol as carbon source**. Chem. Eng. Technol. 2015, v. 38, no. 9, p. 1659- 1664.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; PACHECO, M.T.B.; SGARBIERIII, V.C. **Chemical composition of yeast biomass (Saccharomyces sp.) and protein nutritive value of integral or mechanically ruptured cells**. Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.17 no.2 Campinas May/Aug. 1997

CARVALHO, Margarida et al. **Succinic acid production from glycerol by *Actinobacillus succinogenes* using dimethylsulfoxide as electron acceptor**. New biotechnology, v. 31, n. 1, p. 133-139, 2014.

CHATZIFRAGKOU, A.; DIETZ, D.; KOMAITIS, M.; ZENG, A.-P.; PAPANIKOLAOU, S. **Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718**. Biotechnology and Bioengineering. 2010. 107(1), 76–84. doi:10.1002/bit.22767

CHENG, Ke-Ke et al. **Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives**. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, v. 6, n. 3, p. 302-318, 2012.

CHOI. S.; SONG. H.; LIM. S.W.; KIM. T.Y.; AHN. J.H.; LEE. J.W.; LEE. M.H.; LEE. S.Y. **Highly selective production of succinic acid by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens* and its efficient purification**. Biotechnonology and Bioengineering. 2016, v. 113, no. 10, p. 2168-2177.

CIMINI, Donatella et al. **Production of succinic acid from *Basfia succiniciproducens* up to the pilot scale from *Arundo donax* hydrolysate**. Bioresource technology, v. 222, p. 355-360, 2016.

CLOMBURG, J. M.; GONZALES, R. **Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals**. Cell Press, Trends in Biotechnology. 2013, v. 31, no. 1, p. 20-28.

CREFBio. Centro de Referência da Cadeia de Biocombustíveis para Agricultura Familiar. **Indicadores de preços médios para cotação industriais 2017**. <http://www.biomercado.com.br/>

DABDOUB, M. J.; BRONZELI, J. L.; RAMPIN, M. A. **Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria**. Química Nova, 32, p. 3, 2009.

DHANYA, B.S.; MISHRA, A.; CHANDEL, ; VERMA, M.L. **Development of sustainable approaches for converting the organic waste to bioenergy**. Science of the Total Environment, v.723, 25, 2020.

DE OLIVEIRA, Sabrina Dias et al. **Mapeamento tecnológico da produção do bio-ácido succínico no cenário brasileiro**. Cadernos de Prospecção, v. 6, n. 2, p. 162, 2013.

DESSIE, W.; XIN, F.; ZHANG, W.; JIANG, Y.; WU, H.; MA, J.; JIANG, M. **Opportunities, challenges, and future perspectives of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes***. Applied Microbiology and Biotechnology. 2018. doi:10.1007/s00253-018-9379-5

DHARMADI, Yandi; MURARKA, Abhishek; GONZALEZ, Ramon. **Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering**. Biotechnology and bioengineering, v. 94, n. 5, p. 821-829, 2006.

GARLAPATI, V.K.; SHANKAR, U.; BUDHIRAJA, A. **Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products**. Biotechnology Reports. 2016. 9, 9–14. doi: 10.1016/j.btre.2015.11.002

GUETTLER, M.V.; RUMLER, D.; JAIN, M.K. ***Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic- acid-producing strain from the bovine rumen**. International Journal of Systematic Bacteriology. 1999, v.49, p.207-216.

HAKOBYAN, Lilit; GABRIELIAN, Lilit; TRCHOUNIAN, Armen. **Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* strains from mineral springs**. International journal of hydrogen energy, v. 37, n. 8, p. 6519-6526, 2012.

HOFER, Alexandra et al. **In-depth characterization of the raw material corn steep liquor and its bioavailability in bioprocesses of *Penicillium chrysogenum***. Process biochemistry, v. 70, p. 20-28, 2018.

HULL, Steven R. *et al.* **Composition of corn steep water during steeping**. Journal of agricultural and food chemistry, v. 44, n. 7, p. 1857-1863, 1996.

ISAR, J.; AGARWAL, L.; SARAN, S.; SAXENA, R.K. **Succinic acid production from *Bacteroides fragilis*: Process optimization and scale up in a bioreactor**. Anaerobe. 2006. 12(5-6), 231–237. doi:10.1016/j.anaerobe.2006.07.001

JANSEN, Mickel LA; VAN GULIK, Walter M. **Towards large scale fermentative production of succinic acid**. Current opinion in biotechnology, v. 30, p. 190-197, 2014.

JARAMILLO, L. Y. A. **Biossíntese de ácido succínico a partir de glicerina bruta residual: efeito das impurezas e simplificação do meio de produção**. 2019. 148f. 2019. Tese de Doutorado. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

JEON, J-MIN.; THANGAMANI, R.; SONG, E.; LEE, H-W.; LEE H-W.; YANG, Y-H. **Media Optimization of *Corynebacterium glutamicum* for Succinate Production Under Oxygen-Deprived Condition**. J. Microbiol. Biotechnol. 2013. 23(2), 211–217. doi: 10.4014/jmb.1206.06057.

JIANG, Min *et al.* **Progress of succinic acid production from renewable resources: metabolic and fermentative strategies**. Bioresource technology, v. 245, p. 1710-1717, 2017.

KOSAMIA, N.M.; SAMAVI, M.; UPRETY, B.K.; RAKSHIT, S.K. **Valorization of biodiesel byproduct crude glycerol for the production of bioenergy and biochemical**. Catalysts, 2020, 10, 609-629.

KUMAR, Vinod; PARK, Sunghoon. **Potential and limitations of *Klebsiella pneumoniae* as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source**. Biotechnology advances, v. 36, n. 1, p. 150-167, 2018.

KUMAR, Lalit R. *et al.* **A review on variation in crude glycerol composition, biovalorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production.** Bioresource Technology, v. 293, p. 122155, 2019.

LANGE, Anna *et al.* **Bio-based succinate from sucrose: high-resolution <sup>13</sup>C metabolic flux analysis and metabolic engineering of the rumen bacterium *Basfia succiniciproducens*.** Metabolic engineering, v. 44, p. 198-212, 2017.

LEE, P.C.; LEE, W.G.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. **Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production.** Process Biochemistry. 1999. 35(1-2), 49–55. doi:10.1016/s0032-9592(99)00031-x

LEE, P. C. *et al.* **Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor.** Bioprocess and biosystems engineering, v. 26, n. 1, p. 63-67, 2003.

LENARDÃO, E.J.; FREITG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A.C.F.; SILVEIRA, C.C. “Green Chemistry” – **Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa.** Química Nova, v. 26, 1, 123-129, 2003.

LEONETI, A.B.; LEONETI, V.A.; OLIVEIRA, S.V.W.B. **Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol.** Renewable Energy. 2012, 138-145.

LI, Jian *et al.* **Enhanced production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* with reductive carbon source.** Process Biochemistry, v. 45, n. 6, p. 980-985, 2010.

LI, Xinxin *et al.* **Effect of different levels of corn steep liquor addition on fermentation characteristics and aerobic stability of fresh rice straw silage.** Animal Nutrition, v. 2, n. 4, p. 345-350, 2016.

LIU, Xiaoyan *et al.* **Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using corn steep liquor as a source of organic nitrogen and vitamins.** Industrial Crops and Products, v. 78, p. 154-160, 2015.

MATHIAS, T.R.S.; MELLO, P.P.M.; SERVULO, E.F.C. **Caracterização de resíduos cervejeiros.** XX COBEQ – Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, Santa Catarina, 2014.

MATHIAS, T. R. S. **Aproveitamento biotecnológico de resíduos industriais cervejeiros.** 2015. 198f. 2015. Tese de Doutorado. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MAZIÈRE, Audrey *et al.* **A review of progress in (bio) catalytic routes from/to renewable succinic acid.** Biofuels, Bioproducts and Biorefining, v. 11, n. 5, p. 908-931, 2017.

MCKINLAY, J.B.; VIEILLE, C. **C-metabolic flux analysis of *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism at different NaHCO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub> concentrations.** Metab. Eng. 2008, v.10, p.55-68.

NDA-UMAR, U.I.; RAMLI, I.; TAUFIQ-YAP, Y.H.; MUHAMAD, E.N. **An Overview of Recent Research in the Conversion of Glycerol into Biofuels, Fuel Additives and other Bio-Based Chemicals.** Catalysts 2019, 9, 15. <https://doi.org/10.3390/catal9010015>

NGHIEM, N.; KLEFF, S.; SCHWEGMANN, S. **Succinic Acid: Technology Development and Commercialization.** Fermentation. 2017. 3(2), 26. doi:10.3390/fermentation3020026

PATERAKI, C.; PATSALOU, M.; VLYSIDIS, A.; KOPSAHELIS, N.; WEBB, C.; KOUTINAS, A.A.; KOUTINAS, M. ***Actinobacillus succinogenes*: Advances on succinic acid production and prospects for development of integrated biorefineries.** Review article. Biochemical Engineering Journal. 2016, v.112, p. 285-303.

PHANSROY, Nichanan *et al.* **Microbial fuel cells equipped with an iron-plated carbon-felt anode and *Shewanella oneidensis* MR-1 with corn steep liquor as a fuel.** Journal of bioscience and bioengineering, v. 126, n. 4, p. 514-521, 2018.

POSADA, J.A.; RINCON, L.E.; CARDONA, C.A. **Desing and analysis of biorefineries on raw glycerol: Addressing the glycerol problem.** Bioresource Technology. 2012, v.11, p.282-293.

QUISPE, C. A. G; CORONADO, C.J.R; CARVALHO, J. A. **Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2013, no. 24, p. 475-493.

Rivas B, Moldes AB, Domínguez JM, Parajó JC. **Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*.** Int J Food Microbiol. 2004 1;97(1):93-98.

RODRIGUES, C.V.; SANTANA, K.O.; NESPECA, M.G.; OLIVEIRA, J.E.; MAINTINGUER, S.I. **Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction.** International Journal of Hidrogen Energy, 41: 14641-14651, 2016.

RUSSMAYER, H.; EGERMEIER, M.; KALEMASI, D.; SAUER, M. **Spotlight on biodiversity of microbial cell factories for glycerol conversion.** Biotechnology Advances. 2019. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.05.001.

SADHUKHAN, S.; VILLA, R.; SARKAR, U. **Microbial production of succinic acid using crude and purified glycerol from a *Crotalaria juncea* based biorefinery.** Biotechnology Reports, v. 10, 2016, 84-93.

SAKSINCHAI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; VERDUYN, C. **Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*: a physiological study.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 17, n. 3, p. 307-316, 2001.

SALVACHÚA, Davinia *et al.* **Succinic acid production from lignocellulosic hydrolysate by *Basfia succiniciproducens*.** Bioresource technology, v. 214, p. 558-566, 2016.

SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. **Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production.** Annals of Microbiology. 2014. v64(3), 891–898. doi:10.1007/s13213-013-0767-x

SANTIN, Ana Paula *et al.* **Estudo da secagem e da inativação de leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*.** 1996.

SAXENA, R. K. *et al.* **Production and applications of succinic acid.** In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, 2017. p. 601-630.

SAYED, Enas Taha *et al.* **Catalytic activity of yeast extract in biofuel cell.** Journal of bioscience and bioengineering, v. 114, n. 5, p. 521-525, 2012.

SCHINDLER, Bryan D.; JOSHI, Rajasi V.; VIEILLE, Claire. **Respiratory glycerol metabolism of *Actinobacillus succinogenes* 130Z for succinate production.** Journal of industrial microbiology & biotechnology, v. 41, n. 9, p. 1339-1352, 2014.

SCHOLTEN, Edzard; DÄGELE, Dirk. **Succinic acid production by a newly isolated bacterium.** Biotechnology letters, v. 30, n. 12, p. 2143-2146, 2008.

SHEN, N.; WANG, Q.; QIN, Y.; ZHU, J.; ZHU, Q.; MI, H.; WEI, Y.; HUANG, R. **Optimization of succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes* GXAS137 using response surface methodology (RSM).** Food Science and Biotechnology. 2014. v23(6), 1911–1919. doi:10.1007/s10068-014-0261-7

SHEN, N-K.; LIAO, S.-M.; WANG, Q.-Y.; QIN, Y.; ZHU, Q.-X.; ZHU, J.; LI, Y.; HUANG, R.-B. **Economical succinic acid production from sugarcane juice by *Actinobacillus succinogenes* supplemented with corn steep liquor and peanut meal as nitrogen sources.** Sugar Tech 18, 292–298 (2015).

SILVA, V. K. **Extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e prebiótico na dieta pré-inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas.** 2006. 151f. 2006. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SILVA, V. J. **Avaliação do rendimento em massa de extrato de levedura em função da variação do pH e temperatura de autólise.** 2010. 75f. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, Assis.

SONG, Hyohak; LEE, Sang Yup. **Production of succinic acid by bacterial fermentation**. Enzyme and microbial technology, v. 39, n. 3, p. 352-361, 2006.

SONG, H.; KIM, T.Y.; CHOI, B.-K.; CHOI, S.J.; NIELSEN, L.K.; CHANG, H.N.; LEE, S.Y. **Development of chemically defined medium for *Mannheimia succiniciproducens* based on its genome sequence**. Applied Microbiology and Biotechnology. 2008. v79(2), 263–272. doi:10.1007/s00253-008-1425-2

SOUZA, Rafael Limongi; DE LUNA FREIRE, Kristerson Reinaldo; ALMEIDA, Andréa Farias. **Utilização da levedura residual de cervejaria como fonte de nitrogênio para cultivo de bacillus sp**. Revista Saúde & Ciência Online, v. 7, n. 2, p. 441-456, 2018.

SOUZA, Rafael Limongi; ALMEIDA, Andréa Farias. **Aproveitamento de resíduo de levedura cervejeira como fonte de nutrientes para o cultivo de Bacillus sp**. 2016. 50f. 2016. Trabalho de conclusão de curso de graduação. Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, Paraíba.

TAN, J. P. *et al.* **Use of corn steep liquor as an economical nitrogen source for biosuccinic acid production by *Actinobacillus succinogenes***. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2016. p. 012058.

VLYSIDIS, A.; BINNS, M.; WEBBA, C.; THEODOROPOULOS, C. **Glycerol utilisation for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study**. Biochemical Engineering Journal Volumes 58–59, 2011, 1-11.

XI, Yong-lan *et al.* **Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source**. Bioresource technology, v. 136, p. 775-779, 2013.

ZEIKUS, J. G.; JAIN, M. K.; ELANKOVAN, P. **Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products**. Applied microbiology and biotechnology, v. 51, n. 5, p. 545-552, 1999.

WEASTRA, S.R.O. WP 8.1. **Determination of market potential for selected platform chemicals**. Itaconic acid, Succinic acid, 2,5-Furandicarboxylic acid. 7th Framework Programme of the European Union, Knowledge based Bio-Economy, Collaborative Project, Towards a sustainable bio-industry Biotechnology for renewable chemicals and innovative downstream processes. 2013.

WESTBROOK, A.W.; MISCEVIC, D.; KILPATRICK, S.; BRUDER, M. R.; MOO-YOUNG, M.; PERRY CHOU, C. **Strain engineering for microbial production of value-added chemicals and fuels from glycerol**. Biotechnology Advances. 2018. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.10.006